

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické a jaderné chemie



Studium ozonizací triterpenoidů

Study of ozonation of triterpenoids

Ondřej Štěpánek

Diplomová práce
Organická chemie

Praha 2009

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně pod vedením školitele Doc. Ing. Stanislava Smrčka, CSc. a veškeré použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne 5.5.2009

.....

podpis

OBSAH

OBSAH.....	3
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	4
ÚVOD.....	6
CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	7
TEORETICKÁ ČÁST	8
1. Současný stav studované problematiky	9
1.1. Biologické aktivity triterpenoidů	9
1.1.1 Protizánětlivé účinky	9
1.1.2 Hepatoprotektivní účinky	10
1.1.3 Antivirové a anti-HIV účinky	11
1.1.4 Cytotoxické účinky	11
1.1.5 Přehled dalších účinků	12
1.2. Biologicky aktivní triterpenoidy z našeho pracoviště.....	12
1.3. Ozonizace	15
2. Příprava výchozích olefinů	22
2.1. Příprava kyseliny betulinové (I)	22
2.2. Příprava methylesterů II, III a IV	22
2.3. Příprava methylenketonu V	23
2.4. Příprava aldehydu VI.....	23
2.5. Příprava dienu VII.....	24
2.6. Příprava trienu VIII.....	24
3. Ozonizace triterpenoidů	25
3.1. Vliv polarit rozpuštědla	25
3.2. Nenasycený aldehyd 63	27
3.3. Kyselina ursolová (3) a methyl-ester II.....	28
3.4. Kyselina oleanolová (7) a methyl-ester III.....	31
3.5. Methylenketon V	32
3.6. Aldehyd VI	34
3.7. Dien VII a trien VIII.....	35
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
ZÁVĚR	48

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	49
PODĚKOVÁNÍ	53
PŘÍLOHY	54

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ac	acetyl
Ac ₂ O	anhydrid kyseliny octové
Ara	arabinopyranosyl
DMF	<i>N,N</i> -dimethylamid kyseliny mravenčí
DMS	dimethylsulfid
Et ₂ O	diethylether
Et ₃ N	triethylamin
Glc	D-glukopyranosyl
GlcA	D-glucuronopyranosyl
HIV-1	lidský virus imunitní nedostatečnosti
HSV-1	herpes simplex virus typu 1
HSV-2	herpes simplex virus typu 2
IC ₅₀	inhibiční koncentrace (μmol/l) usmrcující 50 % nádorových buněk
K562	lidská promyelocytická leukémie
MCPBA	3-chlorperoxybenzoová kyselina
Me	methyl
MeCN	acetonitril
Mel-2	lidský melanom
MIC	minimální inhibiční koncentrace
NR	nereaguje
P-388	lymfocytická leukémie
PhMe	toluen
py	pyridin
Rha	L-rhamnopyranosyl
RT	laboratorní teplota
RVO	rotační vakuová odparka
SARS	těžký akutní respirační syndrom

TBDMS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -butyl
TEMPO	2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl
TFA	kyselina trifluoroctová
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
XF498	karcinom centrálního nervového systému
Xyl	D-xylopyranosyl

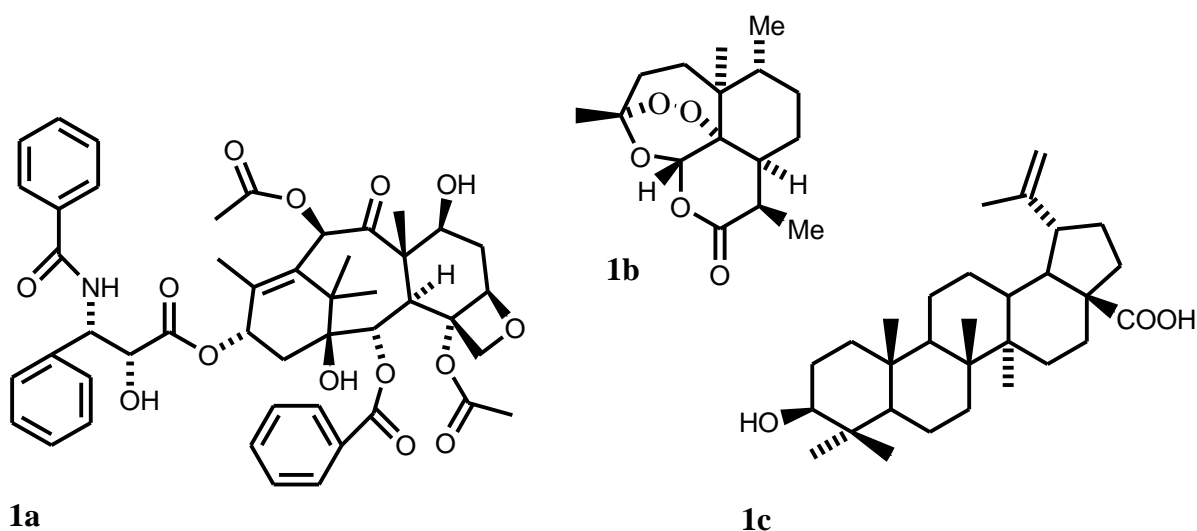
Poznámka k číslování

V této práci budou použity dva druhy číslování sloučenin. Látky v této práci nepřipravované budou značeny arabskými číslicemi. Sloučeniny nově připravené nebo již v literatuře popsané, které byly v rámci této práce připravené, budou značeny číslicemi římskými.

ÚVOD

Při hledání nových léčiv na nejrůznější nemoci se lidstvo již od historie inspirovalo přírodou. Přírodní drogy vždy hrály a stále hrají podstatnou roli při řešení zdravotních problémů a člověk v současnosti v tomto trendu pokračuje. To dosvědčuje fakt, že více než 60 % protinádorových léčiv a více než 75 % léků proti infekčním nemocem obecně je právě přírodního původu.¹

V posledních desetiletích se pozornost farmaceutického a kosmetického průmyslu často obrací k terpenoidům, což jsou látky strukturně odvozené od isoprenu (2-methylbuta-1,3-dienu), vyskytující se nejčastěji v rostlinách a houbách. Vzácněji jsou akumulovány a metabolizovány bakteriemi či syntetizovány živočichy.² Podle počtu isoprenových jednotek se terpeny dělí na monoterpeny, seskvi-, di-, sester-, tri-, tetra- a polyterpeny a spolu se steroly tvoří rozsáhlou skupinu isoprenoidů.² V každé této skupině se nachází řada biologicky aktivních látek, jejichž aktivity zahrnují účinky protinádorové, protizánětlivé, hepatoprotektivní, analgetické, hypoglykemické, hypolipidemické, antimikrobiální, antimykotické a antivirové.^{2,3} Jako zástupce lze uvést cytotoxický diterpen taxol (**1a**) izolovaný z *Taxus brevifolia*,⁴ antimalaricky aktivní seskviterpen artemisinin (**1b**),⁵ nebo triterpenickou kyselinu betulinovou (**1c**) která je cytotoxicky aktivní¹ a jejíž semisyntetické deriváty jsou nyní v klinickém testování na anti-HIV aktivitu.⁶



Na našem pracovišti byl prováděn systematický výzkum pentacyklických triterpenoidů zaměřený především na syntézu nových sloučenin s cytotoxickou aktivitou.^{7,8} Tyto látky, strukturně odvozené od 18-lupenu, 20(29)-lupenu, des-E-lupanu

a germanicanu, byly zahrnuty do skupiny označené jako betuliny a jsou chráněné několika mezinárodními patenty.⁹⁻¹¹ V nedávné době se k tomuto přičlenil též výzkum zaměřený na syntézu vhodných anti-HIV aktivních derivátů.¹²

V rámci zmiňovaného výzkumu se provádí řada modifikačních reakcí triterpenického skeletu a studují se produkty reakcí, které na triterpenoidech probíhají často poněkud anomálně.¹³ Jedním typem těchto anomálně probíhajících reakcí jsou například ozonizace.¹⁴ Studium jejích produktů může vést k řadě zajímavých, dosud nepopsaných látek. Tématem ozonizací triterpenoidů se zabývá také tato diplomová práce.

CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE:

- Literární rešerše ozonizací triterpenoidů.
- Příprava výchozích olefinů pro ozonizace.
- Ozonizace triterpenoidů a detailní studium ozonizačních produktů.

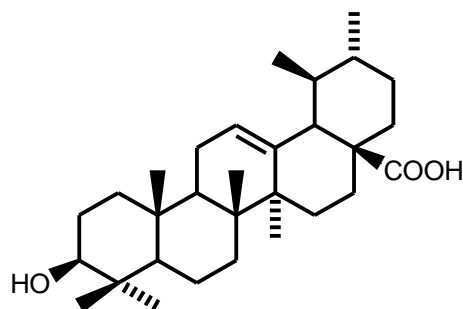
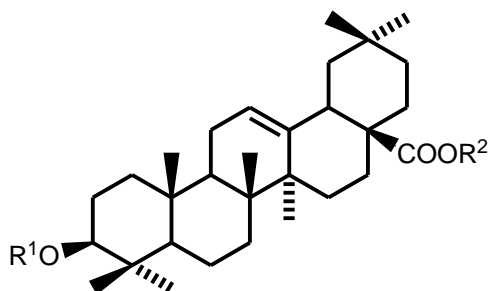
TEORETICKÁ ČÁST

1. Současný stav studované problematiky

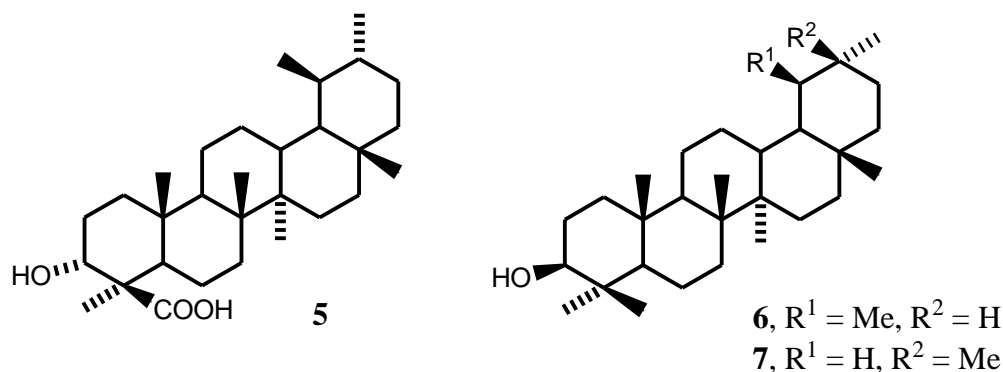
1.1. Biologické aktivity triterpenoidů

1.1.1 Protizánětlivé účinky

Triterpenoidy disponují celou řadou biologických aktivit.^{2,3} Jejich hojný výskyt ve vyšších rostlinách odedávna vedl k využívání těchto rostlin v lidovém léčitelství.¹⁵ Například v tradiční čínské medicíně je používán kořen popínavé rostliny *Codonopsis lanceolata* pro léčbu plicních onemocnění, revmatismu, menstruačních obtíží a zánětů.¹⁶ Fytochemické a farmakologické studie odhalily v tomto kořenu saponiny oleananového typu (codonolasidy), které jsou odpovědné za biologické aktivity a dále byly studovány jejich protizánětlivé účinky. Codonolasidy II a III (**2**, **3**) mají dokonce vyšší protizánětlivé účinky než kyselina acetylsalicylová a jsou srovnatelné s indomethacinem.¹⁶ Další sloučeninou s výraznými protizánětlivými účinky je kyselina ursolová (**4**), hojně přítomná např. v některém ovoci (jablka, borůvky, olivy)¹⁷ a kořenech ženšenu ve formě glykosidů.¹⁸ Silné protizánětlivé účinky vykazuje též kyselina β -boswellová (**5**) a její deriváty, přítomné v pryskyřici stromu *Boswellia serrata*,¹⁹ či α a β -amyrin (**6**, **7**), který působí proti zánětu ozubice na myším modelu.²⁰

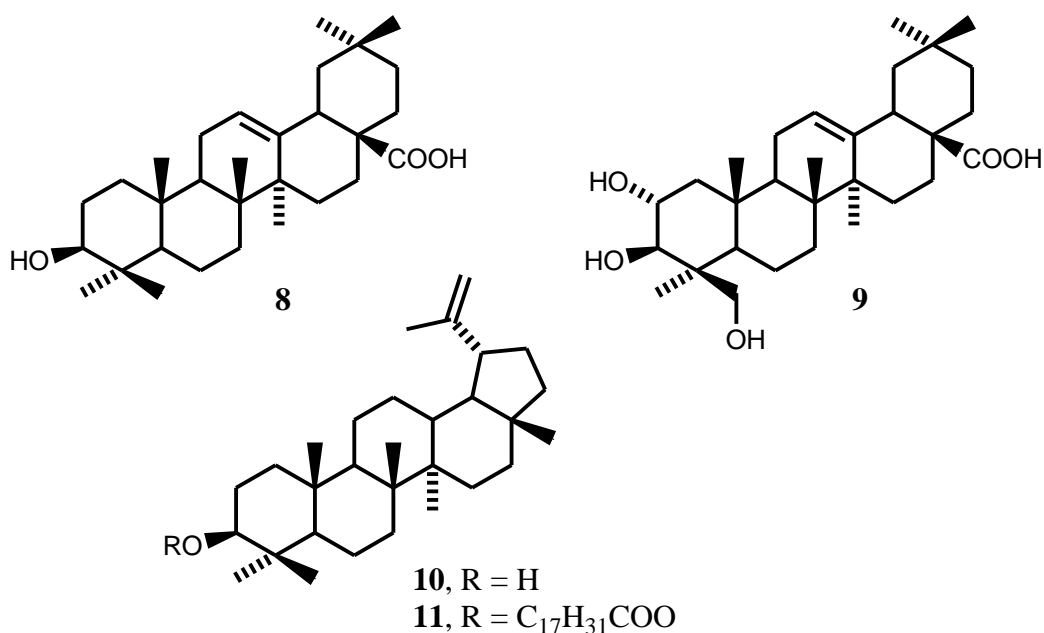


- 2**, $R^1 = H$, $R^2 = \text{Xyl}(1 \rightarrow 4)\text{-Rha}(1 \rightarrow 2)\text{-Ara-}$ **4**
3, $R^1 = \text{Xyl}(1 \rightarrow 3)\text{-GlcA-}$,
 $R^2 = \text{Xyl}(1 \rightarrow 4)\text{-Rha}(1 \rightarrow 2)[\text{Glc}(1 \rightarrow 4)]\text{-Ara-}$



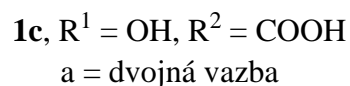
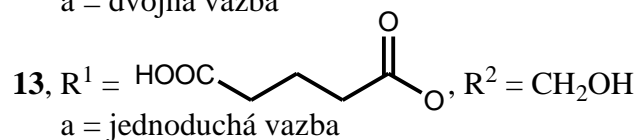
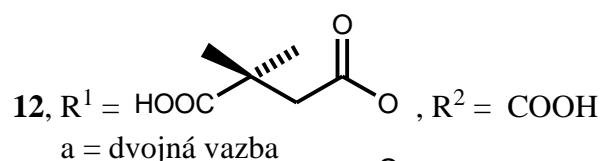
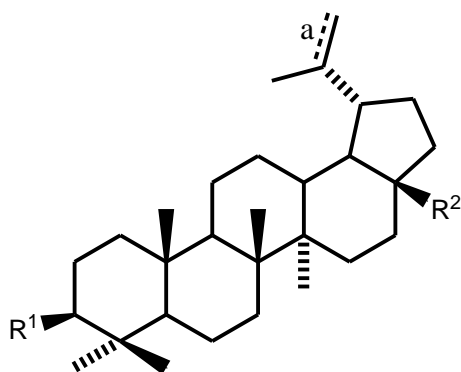
1.1.2 Hepatoprotektivní účinky

Inspiraci pro odhalení a studium hepatoprotektivních účinků některých terpenoidů poskytla opět lidová medicína, zvláště pak ta čínská.²¹ Významné hepatoprotektivní účinky proti chemicky vyvolanému poškození jater jsou popsány u izomerních kyselin - ursolové (**4**) a oleanolové (**8**).²² Předpokládá se, že mechanismem účinku je snížení oxidativního stresu (pohlcování peroxidových radikálů) a inhibice cytochromu P450, neboť mnoho xenobiotik se toxickými stává právě až po jejich metabolické přeměně v játrech.^{22,23} Takto účinkují například izomerní α , β -amyriny (**6**, **7**) proti poškození jater vyvolanému acetaminofenem,²³ nebo kyselina arjunolová (**9**) při poškození způsobeném sloučeninami arsenu.²⁴ Také bylo zjištěno, že v případě podávání lupeolu (**10**) či lupeol-linoleátu (**11**) několik dní před intoxikací sloučeninami kadmia se sníží poškození jaterní tkáně u myši,²⁵ přičemž lupeol-linoleát (**11**) je účinnější než lupeol (**10**).



1.1.3 Antivirové a anti-HIV účinky

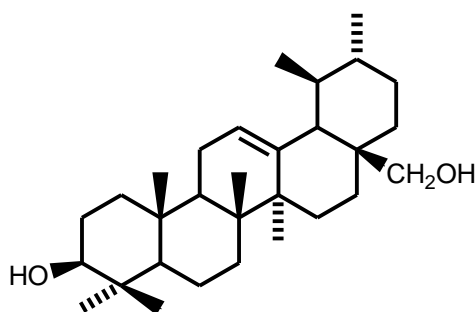
U lupanových derivátů je popsána účinnost proti virům ze šesti různých skupin,¹² mezi něž patří i HIV-1 virus ze skupiny *Retroviridae*.⁶ Dále jsou tyto deriváty účinné například proti virům HSV-1 a HSV-2 ze skupiny *Herpesviridae*,²⁶ viru hepatitidy C ze skupiny *Flaviviridae*,²⁷ či viru SARS ze skupiny *Coronaviridae*.²⁸ Mechanismus účinku, jímž lupanové triterpenoidy působí, je bezpečně znám pouze u HIV-1 viru a ze studie²⁹ vyplynulo, že se jedná o zcela nový typ mechanismu, kdy dochází k inhibici štěpení proteinu p25 na protein p24 při maturaci (zrání) viru HIV-1 a štěpení polyproteinu Gag.⁶ Tímto způsobem účinkuje i 3β-O-(3',3'-dimethylsukcinát) **12** (známý též jako Bevirimat, PA-457),⁶ který se v současné době nachází ve druhé fázi klinických testů. Kromě tohoto derivátu bylo připraveno několik analogických látek (např. dihydrobetulin-3β-O-hemiglutarát (**13**)),³⁰ jejichž aktivita je srovnatelná, nebo dokonce vyšší, než u PA-457.³¹ Výhodou těchto látek je, že jsou účinné i vůči kmenům, které jsou rezistentní proti virostatikům s jiným mechanismem účinku.⁶



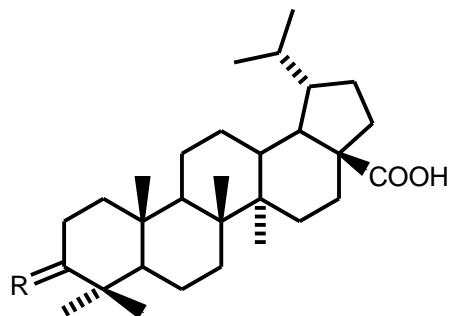
1.1.4 Cytotoxické účinky

Již od roku 1976 jsou známy cytotoxické účinky u kyseliny betulinové (**1c**) a jejích derivátů, když byly společně s kyselinou ursolovou (**3**) a uvaolem (**14**) identifikovány jako majoritní složky extraktu z *Vauquelinia corymbosa* účinného vůči lymfocytární leukémii P-388.² Podrobnějšího zkoumání se kyselině betulinové (**1c**) dostalo až v devadesátých letech, kdy byl popsán její cytotoxický účinek proti buněčné linii lidského melanomu.³² Kyselina betulinová (**1c**) dále vykazuje selektivní cytotoxickou aktivitu ($\text{IC}_{50} < 7 \mu\text{mol/l}$) vůči buňkám Mel-2, XF498,³³ proti neuroblastomu, medulloblastomu a glioblastomu.³⁴ Dále bylo připraveno několik skupin syntetických derivátů kyseliny betulinové (**1c**), modifikovaných v poloze 2, 3, 20, 29, 30 a esterifikací C-28 karboxylové skupiny. Některé

tyto deriváty, jako například kyselina dihydrobetulinová (**15**), či dihydrobetulonová (**16**), rovněž vykazaly cytotoxické účinky.³³⁻³⁵



14



15, R = α -H, β -OH

16, R = O

Dále cytotoxickou aktivitu vykazaly některé látky odvozené od oleananového a ursanového skeletu, zejména kyselina oleanolová (**8**), ursolová (**4**)^{8,36} a triterpeny izolované z kosatce německého (*Iris germanica*), tzv. iridaly,³⁷ aktivní vůči nádorové linii K562. Cytotoxicky aktivní jsou rovněž některé triterpenické glykosidy; nejznámější skupinou jsou saponiny s damaranovým skeletem obsažené v kořeni *Panax ginseng* (ginsenosidy), které např. indukují apoptózu buněk rakoviny prostaty.³⁸

1.1.5 Přehled dalších účinků

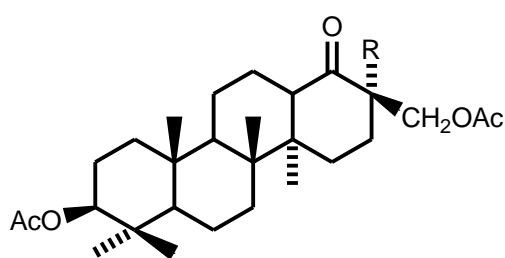
Kromě již zmíněných biologických aktivit jsou triterpenoidy studovány také v souvislosti s účinky analgetickými, hypoglykemickými, hypolipidemickými, antimikrobiálními, antimykotickými, imunomodulačními, tonizujícími a používají se při léčbě a prevenci hepatitidy, parazitárních a protozoálních infekcí.² Podrobný přehled těchto aktivit je nad rámec této práce; viz např.^{2,3}

1.2. Biologicky aktivní triterpenoidy z našeho pracoviště

V uplynulých padesáti letech byl v laboratoři přírodních látek na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy prováděn základní výzkum triterpenoidů, který se v posledním desetiletí zaměřoval především na syntézu cytotoxicky aktivních sloučenin. Tyto látky spadají mezi deriváty lupanového, des-E-lupanového a oleananového skeletu a souhrnně bývají označovány jako betulininy.⁸ Testování cytotoxicity bylo později rozšířeno

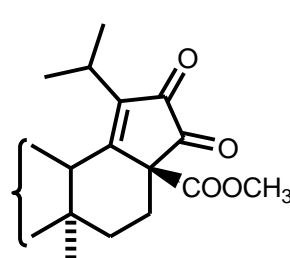
o testování antimikrobiálních aktivit a v případě hemiesterů také o testování anti-HIV aktivit.

Za cytotoxicky významně aktivní jsou považovány takové látky, jejichž hodnota $IC_{50} < 10 \mu\text{mol/l}$. Mezi betuliny je takových látek několik a jako nejúčinnější sloučeniny se projevily β -ketokyselina **17** a tetranorkyselina **18**, které jsou odvozeny od des-E lupanového skeletu.^{8,9,39} Některé výše oxidované deriváty lup-18-enu a lup-20(29)-enu mají také vysokou cytotoxickou aktivitu, např. methylester **19** a nenasycený aldehyd **20**.⁸

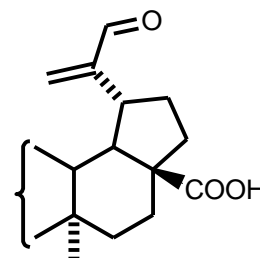


17, R = COOH

18, R = CH₂COOH

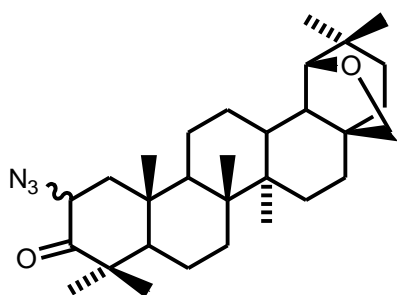


19, 3 β - OAc

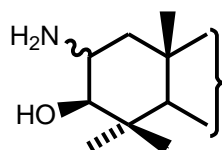


20, 3 β - OH

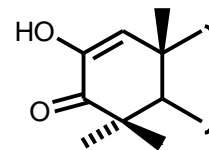
Dále byly připraveny 18 α -oleananové deriváty, které též vykazují poměrně značnou cytotoxicitu,⁴⁰ hlavně v případě azidoketonů **21**, aminoalkoholů **22** a diosfenolu **23**.



21



22



23

sloučenina	IC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)
17	0.24
18	2.30
19	6.10
20	7.20
21	8.10
22	5.30
23	9.00

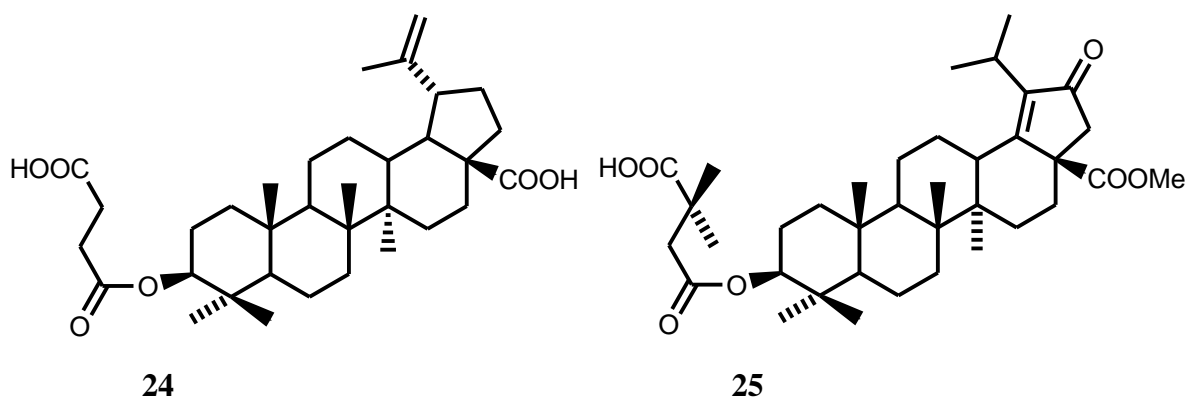
Tabulka 1:

Cytotoxická aktivita sloučenin z našeho pracoviště vůči

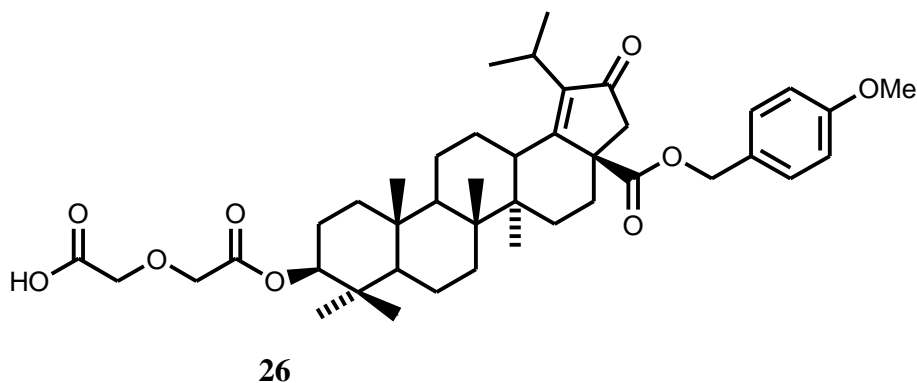
T – lymfoblastické leukémii CEM

U triterpenoidních hemiesterů byly pozorovány antivirotické účinky proti HIV-1 viru⁶ a také na našem pracovišti byla v minulosti připravena řada derivátů odvozených od nižších dikyselin.⁴¹⁻⁴⁴ U některých z těchto látek bylo zjištěno zvýšení cytotoxické aktivity⁴¹ (např. hemiester **24**) a zlepšení rozpustnosti v médiích založených na vodné bázi.⁴⁵

Dále byly některé z těchto látek testovány na anti-HIV aktivitu, přičemž výsledky které vykázaly, vedly k uzavření licenční smlouvy o testování dalších derivátů s kanadskou firmou Virochem Pharma Inc. Příprava těchto derivátů byla cílem diplomové práce¹² a některé připravené deriváty předběžně vykazují aktivity srovnatelné, nebo vyšší než klinicky testovaný PA-457. Jako příklad za všechny zde uvádím 3',3'-dimethylhemisukcinát **25**.



V rámci práce¹² bylo, kromě anti-HIV testování, prováděno také testování antimikrobiální aktivity. Jako aktivní se ukázaly pouze některé diglykoláty - proti mikrobům z rodu *Staphylococcus* a *Enterococcus*. Jako příklad lze uvést ester **26**, jehož MIC proti kmenu *Enterococcus faecialis* dosáhla 12.5 $\mu\text{mol/l}$.¹²



1.3. Ozonizace

V rámci výzkumu triterpenoidů na našem pracovišti se v letech 2001 – 2008 prováděla řada modifikačních reakcí. Tyto reakce se prováděly za účelem přípravy nových biologicky aktivních látek a také za účelem optimalizace farmaceutických a farmakologických vlastností látek již známých. Vzhledem k faktu, že výše oxidované deriváty triterpenoidů bývají často cytotoxicky aktivní,³⁹ je jedna z možností funkcionalizace také reakce s ozonem. Ta ovšem, jak je u triterpenoidů časté, neprobíhá zcela standardním způsobem.

Ozon byl objeven roku 1840 Christianem Friedrichem Schönbeinem jako vedlejší produkt během elektrolýzy vody okyselené kyselinou sírovou.⁴⁶ V průmyslu se ozon využívá především k dezinfekci vody, kde nahrazuje běžnější, lacinější, ale zdravotně méně výhodný chlor, dále jako bělicí prostředek textilií, v potravinářství k dezinfekci provozoven, ke konzervaci potravin a k povrchovému ošetření ovoce a zeleniny proti plísním.⁴⁷

Ozonolýza, tedy oxidativní štěpení dvojných vazeb ozonem, původně sloužila hlavně jako prostředek k určování chemické struktury organických látek. Mechanismus ozonolýzy byl navržen Rudolfem Criegee⁴⁸ v roce 1953 (schéma 1) a později ověřen⁴⁹ pomocí ¹⁷O NMR spektroskopie. Nejprve dochází k 1,3 dipolární cykloadici ozonu na dvojnou vazbu za vzniku molozonidu, který se rozpadá na zwitterion. Z něj dále vzniká ozonid, který však obvykle bývá natolik nestabilní (explozivní), že se ihned dále zpracovává – produkty jsou buď aldehydy a ketony v případě redukčního zpracování, nebo kyseliny a ketony v případě oxidativního zpracování.

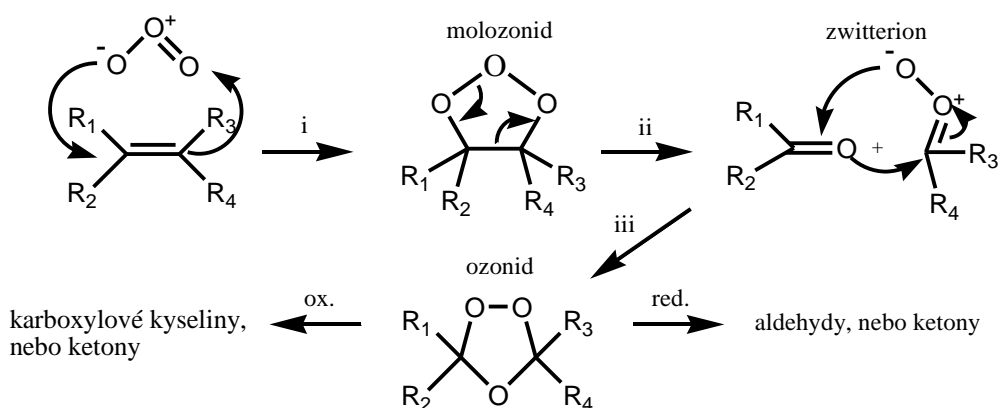
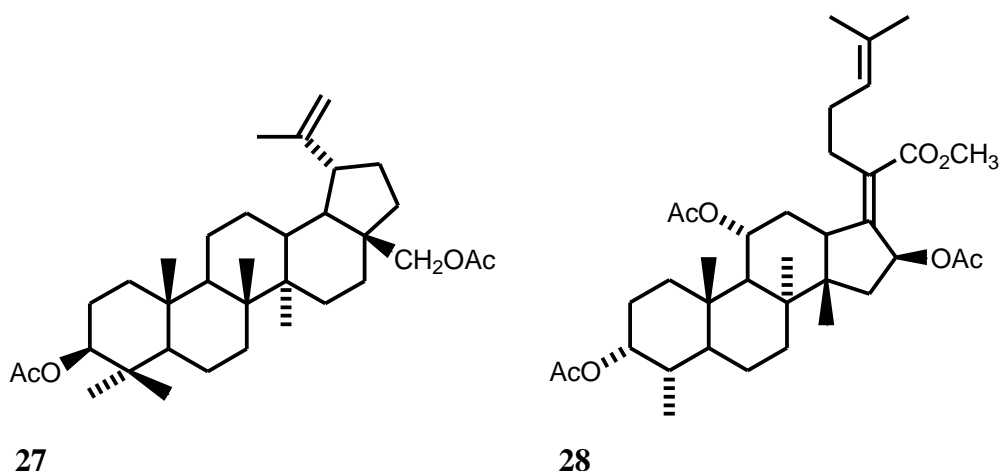


Schéma 1 : Mechanismus ozonizace

i. 1,3 cykloadice, ii. rozpad molozonidu, iii. karbonylový flip

První zmínky o ozonizacích triterpenoidů se objevují již v průkopnických pracích Ruzicky^{50,51} ze třicátých a čtyřicátých let minulého století. V článku⁵⁰ z roku 1942 je popisována ozonizace betulin-diacetátu (**27**), jejíž různé zpracování vedlo ke vzniku „diacetoxy-norlupanonu“ a methylesteru „diacetoxy-bisnorlupanové kyseliny.“ O strukturách těchto látek je však třeba pochybovat, neboť nejsou doloženy žádnou spektrální metodou a už lupanový skelet těchto sloučenin je zakreslen nepřesně, betulin-diacetát (**27**) nevyjímaje. Obdobná situace panuje též v práci⁵¹ z roku 1945, kde je popisována ozonizace α -amiradienonu.



Syntetické využití ozonu jako účinného štěpícího činidla pro dvojné vazby bylo publikováno v práci⁵² z roku 1977. Autoři původně používali k odbourání postranního řetězce v poloze 17 u triacetátu **28**, odvozeného od methylfusidátu, oxid rutheničitý s jodistanem sodným, nebo s chlornanem sodným, ale reakční doba byla až tři týdny. Při použití ozonu se při srovnatelných výtěžcích reakční doba zkrátila na 8 hodin.

Podobně, jako v předchozím příkladu, byl při funkcionalizaci derivátu kyseliny oleanolové s kontrahovaným kruhem A **29** použit ozon pro získání ketonu **30** (schéma 2).⁵³

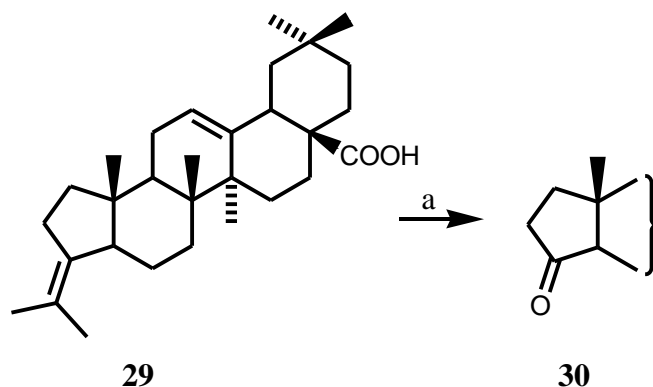


Schéma 2: a: O_3 / CH_2Cl_2 , py ($-78\text{ }^{\circ}C$)

Zajímavější jsou poznatky finských autorů z roku 1977,^{54,55} kdy bylo zjištěno, že je-li dvojná vazba diacetátu **31** podrobena epoxidací MCPBA, vzniká jako hlavní produkt β -epoxid **32a**, zatímco je-li podroben reakci s ozonem, je produktem α -epoxid **32b**. Nicméně tyto produkty je nutno ještě doplnit o stabilní ozonid (**33**), který je druhým produktem v případě použití ozonu; poměr produktů je 2:1 ve prospěch epoxidu **32b**¹⁴ (schéma 3).

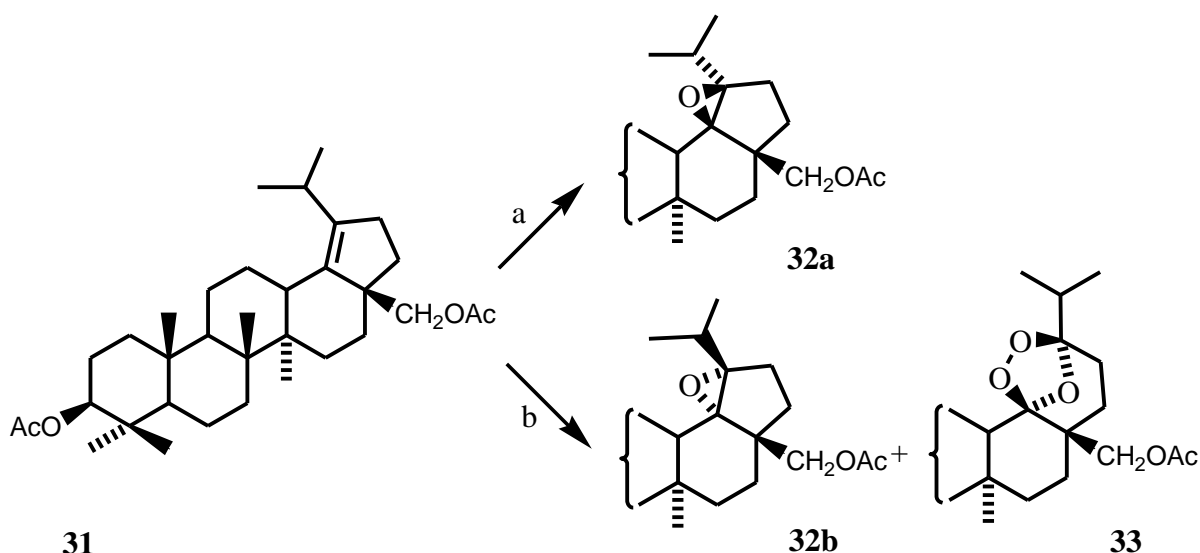


Schéma 3: a: 1. O₃ / CHCl₃, MeOH (-80 °C), 2. DMS (RT);
b: MCPBA, NaHCO₃ / CH₂Cl₂ (RT)

Z roku 2004 pochází práce⁵⁶ zabývající se oxidací triterpenoidních dienů a trienů odvozených od oleanolové kyseliny (**7**). Mimo jiných oxidačních činidel byla řada těchto derivátů podrobena reakci s ozonem, přičemž výsledkem byla zpravidla směs produktů. Takto byl z dienu **34** atakem C-28 methoxykarbonylové skupiny na dříve vznikající 12,13 epoxid získán lakton **35** jako hlavní produkt (30 %), dále pak diepoxid **36** (15 %), epoxyalkohol **37** (15 %) a ještě minoritní lakton **38** (7 %) (schéma 4). Obdobně reagoval⁵⁶ také oleananový derivát, který byl navíc substituován v poloze 2 α methoxylovou skupinou.

Při pokusech o štěpení triterpenu v oblasti kruhu C byl získán trien **39**, avšak výsledkem jeho štěpení byla velice komplikovaná směs produktů. Při přidavku pyridinu jako kosolventu byl identifikován jediný produkt, epoxydion **40** (12 %) (schéma 5). Ozonizací epoxidu **41** v CH₂Cl₂ a poté v témže rozpouštědle za přidavku pyridinu byla v prvním případě produktem sloučenina **42** (schéma 6), v případě reakce prováděné v přítomnosti pyridinu byl produktem diepoxid **43** (schéma 6). Ale ani další ozonizace diepoxidu **43** nevedla ke štěpení dvojných vazeb v poloze 11,12.

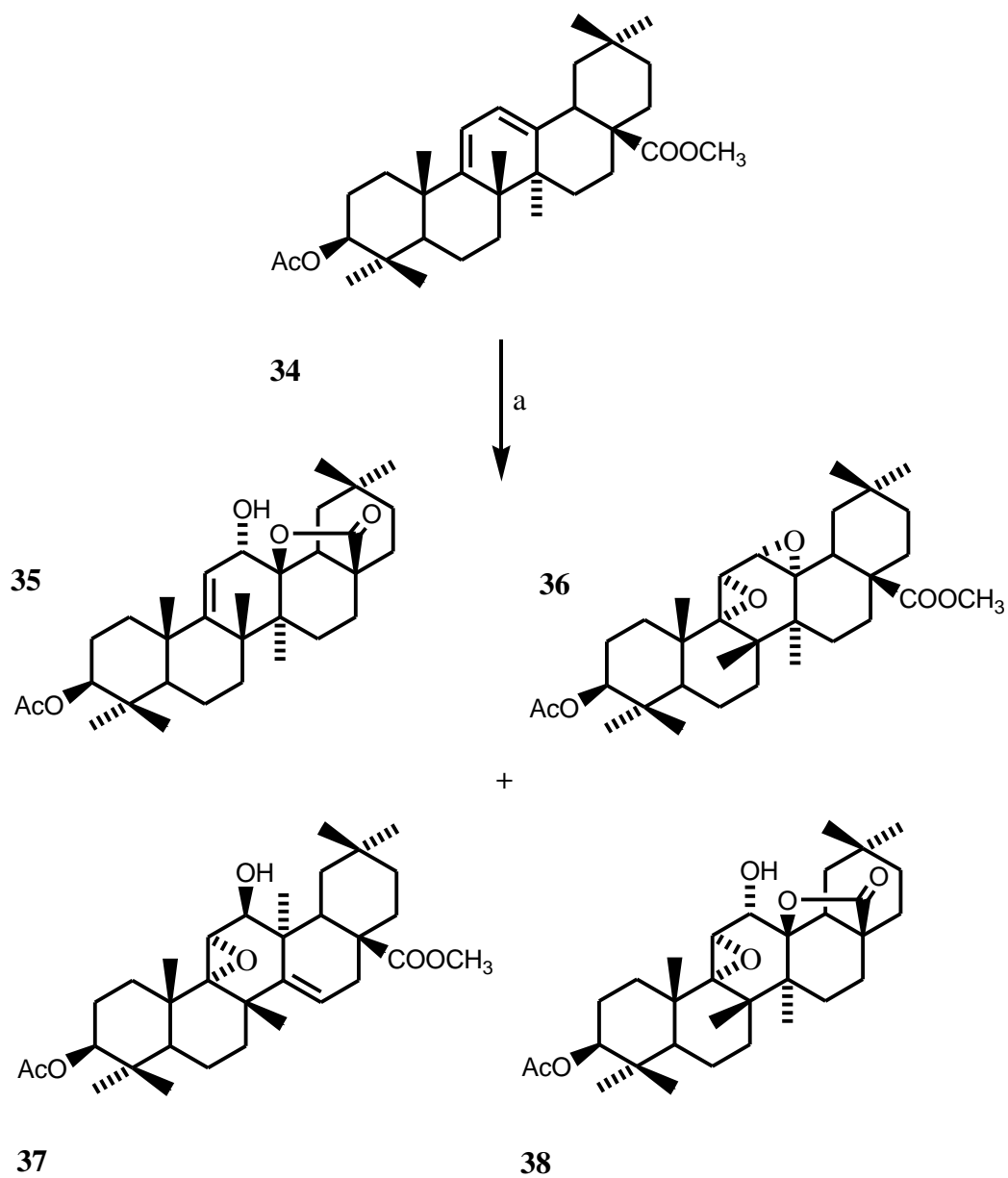


Schéma 4: a: 1. O_3 / CH_2Cl_2 (-78°C) 2. DMS

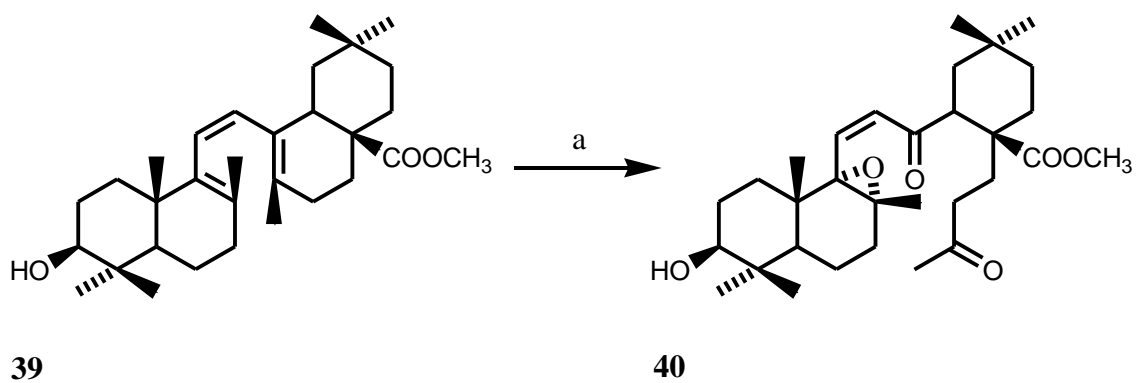


Schéma 5: a: 1. O_3 / CH_2Cl_2 , py (-78°C), 2. DMS

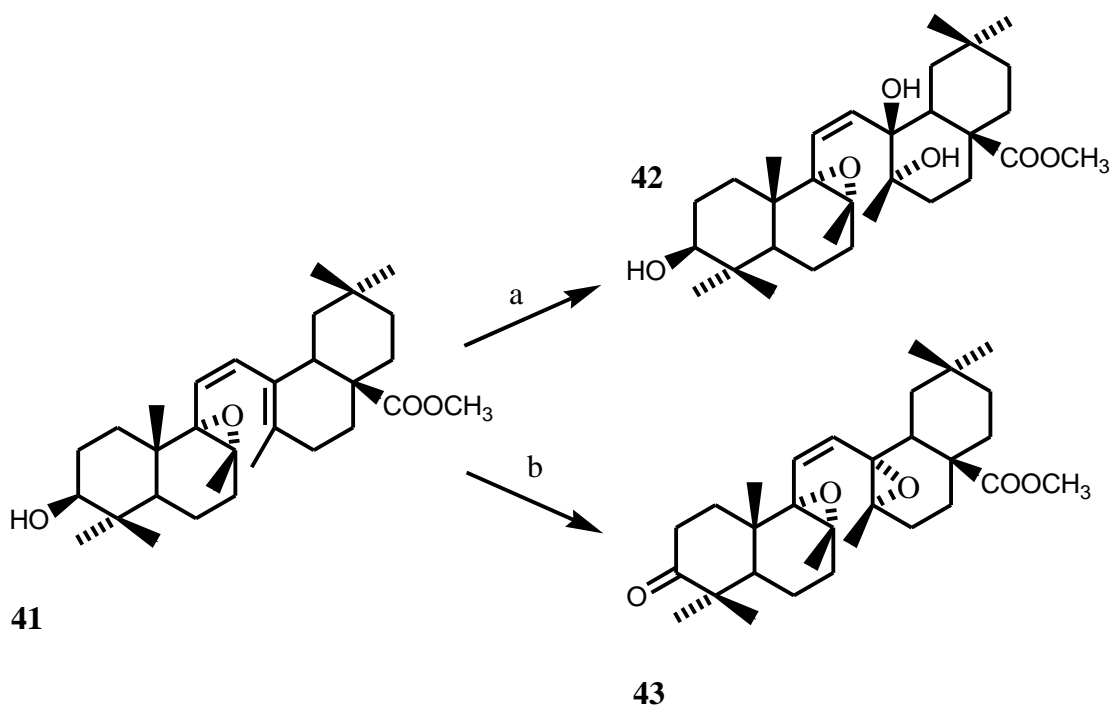


Schéma 6: a: 1. O_3 / CH_2Cl_2 (-78°C), 2. DMS;
b: 1. O_3 / CH_2Cl_2 , py (-78°C), 2. DMS

Taktéž při pokusech o štěpení trienu **44** nebylo dosaženo požadovaného výsledku, jelikož ozonizací vznikly v nízkém výtěžku izomerní diepoxidy **45** (10 %) a **46** (10 %) (schéma 7) a směs výše oxidovaných sloučenin. Teprve ozonizace epoxydienu **47** (schéma 8) vedla ke štěpení dvojné vazby mezi uhlíky 11 a 12 a ke vzniku čtyř produktů: **48** (31 %), **49** (3 %), **50** (10 %) a **51** (35 %).

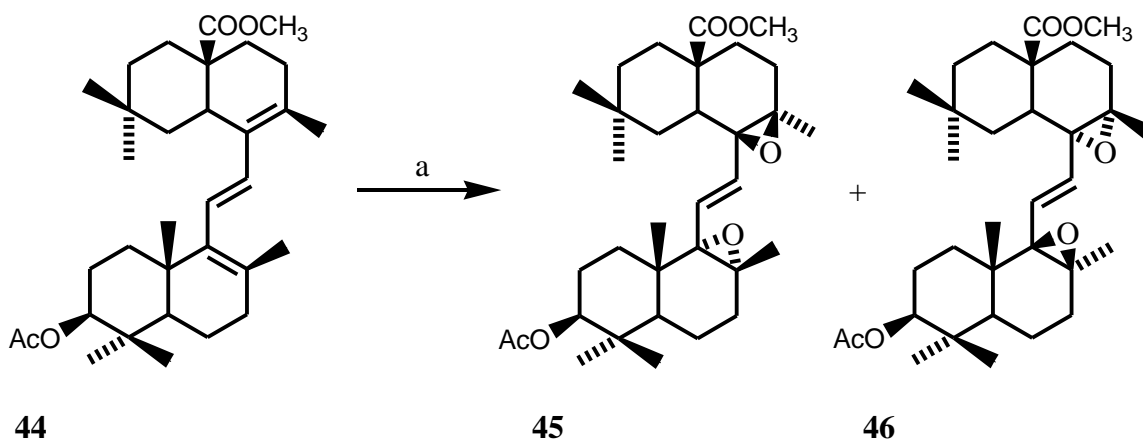


Schéma 7: a: 1. O_3 / CH_2Cl_2 (-78°C), 2. DMS

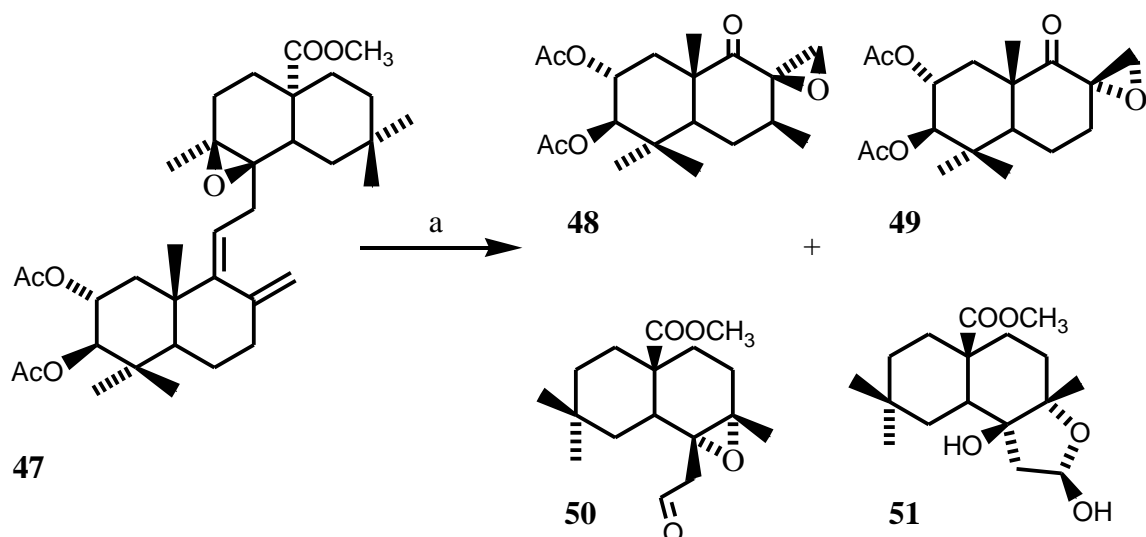


Schéma 8: a: 1. O_3 / CH_2Cl_2 (-78°C), 2. DMS

Využití nachází ozonolýza také ve steroidní chemii, kdy lze regioselektivně oxidovat dvojnou vazbu na postranním řetězci (C19-C20) alkenu **52**, vedle dvojně vazby na kruhu A.⁵⁷ Výtěžek reakce je 70 %, ale je-li prováděna s přidavkem pyridinu, lze docílit zvýšení regioselektivity a výtěžku (snížením nukleofility dvojných vazeb) až na 90 % (schéma 9).⁵⁷

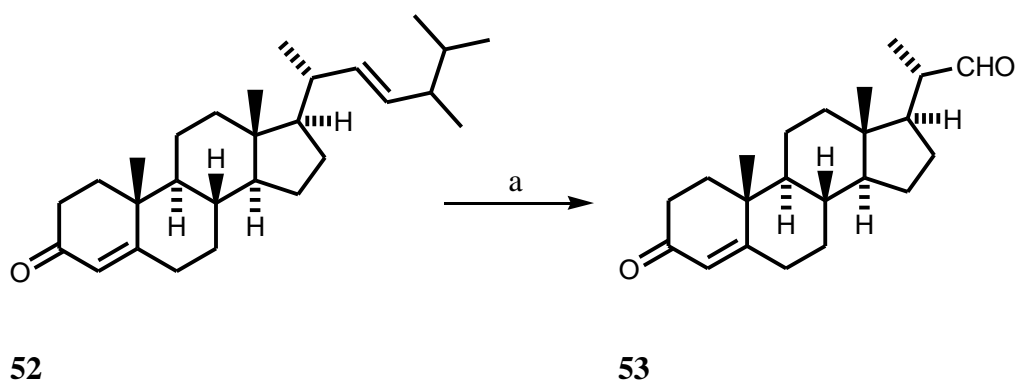


Schéma 9: a: 1. O_3 / CH_2Cl_2 , py (-78°C)

Některé průmyslové syntézy léčiv využívají reakce s ozonem v jednom ze svých kroků. Například při syntéze (+)-artemisininu (**55**) se v posledním kroku využívá ozonolýza kyseliny **54** následované přidavkem vodného roztoku kyseliny sírové a silikagelu⁵⁷ (schéma 10) při výtěžku 35 %. Ozon se také využívá⁵⁷ při Mecklerově syntéze 24(S)-hydroxyvitaminu D_2 k odbourání postranního řetězce derivátu ergokalciferolu **56**. Po následné redukci vzniká hydroxyderivát **57** (schéma 11).

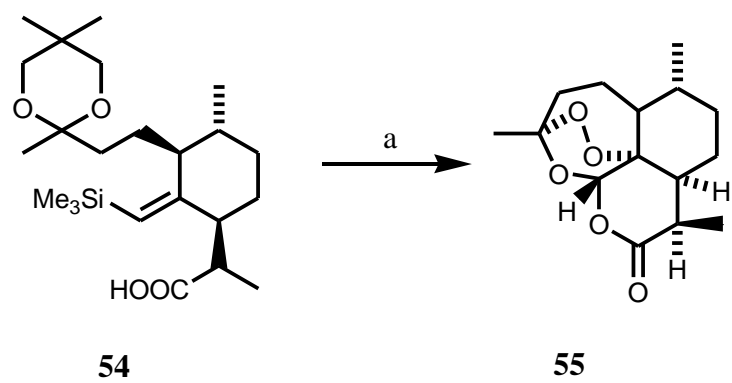


Schéma 10: a: 1. O_3 / CH_2Cl_2 (-78 °C), 2. SiO_2 , 3M H_2SO_4

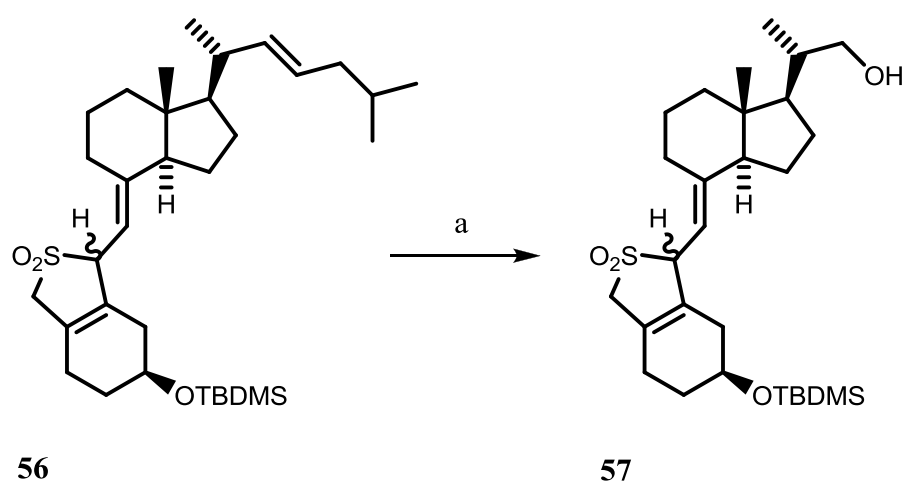


Schéma 11: a: 1. O_3 / MeOH (-25 °C), 2. NaBH_4 / CH_2Cl_2

2. Příprava výchozích olefinů

V rámci této diplomové práce bylo připraveno nebo izolováno z přírodního materiálu 8 nenasycených sloučenin a sice: kyselina betulinová (**I**), methylestery **II**, **III** a **IV**, dále methylenketon **V**, aldehyd **VI**, dien **VII**, trien **VIII**.

2.1. Příprava kyseliny betulinové (**I**)

Kyselina betulinová (**I**) byla získána extrakcí platanové kůry methanolem⁴⁰ a pro další reakce byla čištěna rekrytalizací z methanolu.

2.2. Příprava methylesterů **II**, **III**, **IV**

Methylace byla prováděna dvěma způsoby. Pro methylaci menších množství (do 500 mg) ursolové (**4**) a oleanolové (**8**) kyseliny bylo použito reakce s nadbytkem diazomethanu v chloroformu (schéma 12). V případě methylesterů **II** a **III** se však takto přisunutě množství ukázalo jako nedostačující vzhledem ke komplikacím při jejich pozdější ozonizaci. Pro přisun větších množství bylo nutno použít reakce podle modifikovaného literárního postupu s nadbytkem methylbromidu v roztoku dimethylformamidu a acetonitrilu za přídavku uhličitanu draselného (schéma 12).³⁹ Z hlediska čistoty produktů se druhý způsob nakonec ukázal výhodnější. Výtěžky reakcí se pohybují mezi 85 - 95 %. Struktura produktů byla potvrzena identitou ¹H NMR spekter s literaturou.^{40,58,59}

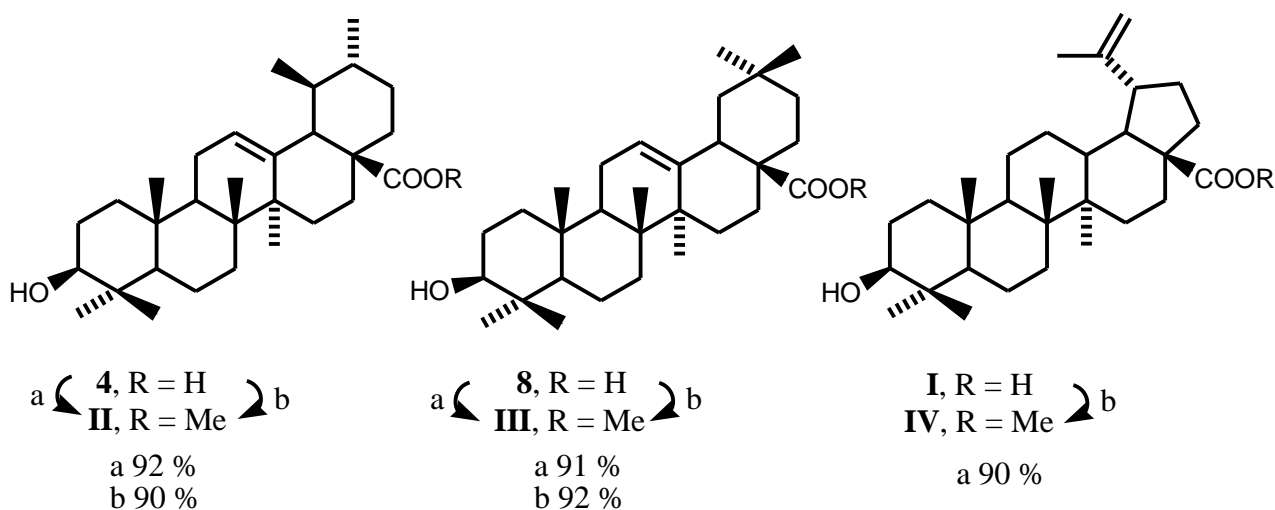


Schéma 12: a: CH₂N₂ / Et₂O, CHCl₃ (RT)

b: MeBr, K₂CO₃ / MeCN, DMF (RT)

2.3. Příprava methylenketonu **V**

Methylenketon **V** byl připraven podle literárního postupu.³⁹ Výchozí látkou byla β -ketokyselina **17**, která reakcí s triethylaminem poskytuje látku **V** (schéma 13). Struktura produktu byla potvrzena porovnáním ^1H NMR spektra s autentickým preparátem.³⁹

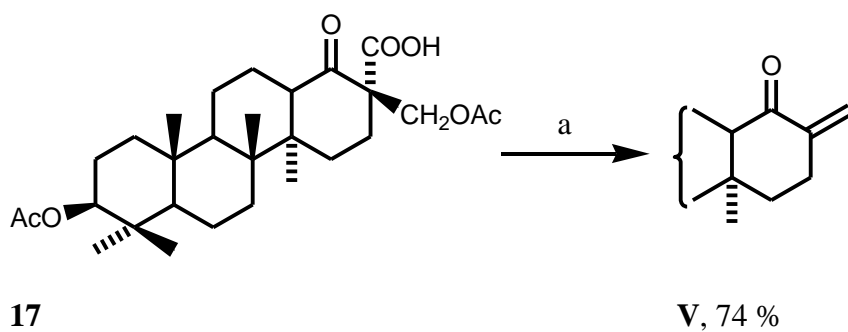


Schéma 13: a: Et_3N / CH_2Cl_2 (RT)

2.4. Příprava aldehydu **VI**

Aldehyd **VI** byl připraven podle modifikovaného literárního postupu.⁶⁰ Výchozí sloučeninou byl betulín (**58**), který byl oxidován směsí TEMPO, komerčního chlornanového bělidla a NaClO_2 (schéma 14). Struktura produktu byla potvrzena porovnáním ^1H NMR spektrálních dat s literaturou.⁶¹

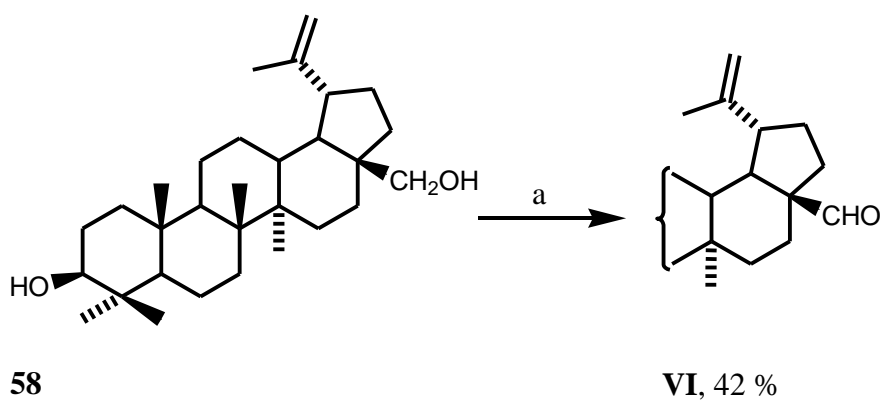


Schéma 14: a: TEMPO, NaClO , NaClO_2 , KH_2PO_4 / CH_2Cl_2 , *t*-BuOH, H_2O (RT)

2.5. Příprava dienu VII

Výchozí sloučeninou pro přípravu dienu **VII** byl methyl-betulinát (**IV**), který byl nejprve převeden na acetát acetanhydridem v pyridinu (schéma 15) podle literárního postupu.³⁹ Další postup vychází z literatury⁶² a využívá dehydrogenaci octanem rtuťnatým v kyselině octové. Nicméně pro přípravu byla použita modifikace této metody,¹³ která vede ke snížení potřebného množství $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ i AcOH při zachování výtěžnosti reakce. Další modifikace spočívala ve využití nasyceného vodného roztoku NaHS ke srážení Hg^{2+} iontů. Struktura produktu byla potvrzena porovnáním ^1H NMR spekter s autentickým preparátem.¹³ Dále byla struktura ověřena RTG difrakcí připraveného monokrystalu.

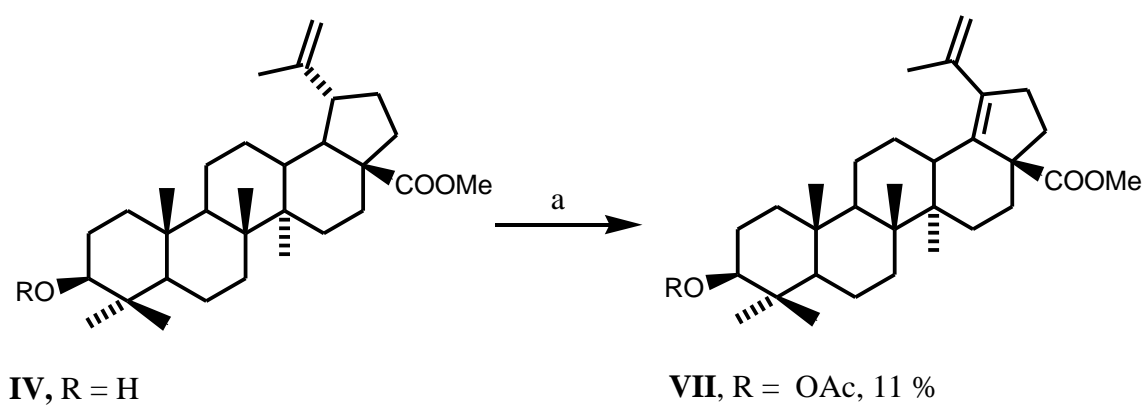


Schéma 15: a: 1. Ac_2O / py (reflux);

2. $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ / AcOH (reflux), CHCl_3 ;

3. NaHS / H_2O , Et_2O (RT)

2.6. Příprava trienu VIII

Příprava trienu **VIII** vycházela z literárního postupu,³⁹ který byl optimalizován již v diplomové práci.¹³ Nejlepších výsledků bylo dosaženo působením HCl na roztok diketonu **59** v methanolu s přidavkem vody (schéma 16). Nicméně i přes optimalizaci reakce je výtěžnost pouze 40 %. Literární postup¹³ využívá separaci pomocí HPLC, která je však nevýhodná pro přísuny větších množství. Proto jsem učinil pokusy o separaci pomocí sloupcové chromatografie, při které se však ukázalo, že takto je reakční směs poměrně obtížně dělitelná. Struktura produktu byla potvrzena porovnáním ^1H NMR spektra s autentickým preparátem.¹³

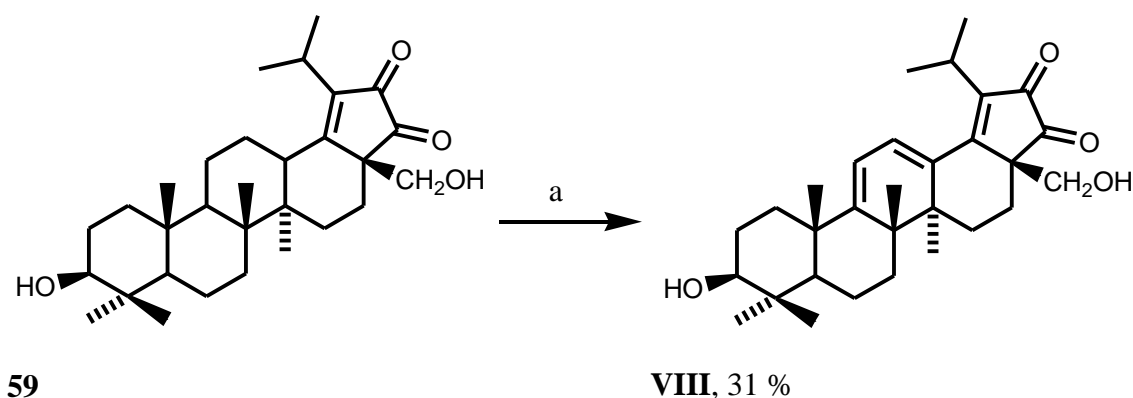


Schéma 16: a: HCl / MeOH, H₂O (40 - 50° C)

3. Ozonizace triterpenoidů

Téměř veškeré ozonizace, jež jsem během diplomové práce prováděl, probíhaly nestandardním způsobem. Častý byl vznik velmi komplikovaných směsí produktů, jejichž separace byla vlastně nejsložitější částí práce. Už sledování reakce pomocí TLC bylo velmi náročné, neboť nebylo možné pouhým okem rozlišit jednotlivé složky směsi.

Zpočátku jsem se pokoušel provádět separace pomocí sloupcové chromatografie, což se ve většině případů ukázalo jako téměř nemožné. Jedinou možností bylo využití HPLC. Takto byla také získána většina produktů.

Pro ozonizace triterpenoidů byl použit modifikovaný postup,¹⁴ který spočíval v průchodu nesusušeného ozonizovaného vzduchu roztokem výchozí látky. Jako rozpouštědlo byl obvykle použit chloroform, méně často směs chloroformu s methanolem (zvyšuje rozpustnost, ale mohou vznikat ethery či acetaly a komplikovat tak separaci směsi). Zpracování bylo prováděno dimethylsulfidem za laboratorní teploty, ale v řadě případů od něj bylo upuštěno, neboť nedocházelo k žádné viditelné reakci, či dokonce reakce vedla k vzniku složitější směsi látek. Tento fakt lze vysvětlit tím, že reakce s největší pravděpodobností neprobíhaly standardním mechanismem (str. 12, schéma 1).

3.1. Vliv polarity rozpouštědla

Z literatury⁶³ je zřejmé, že při reakcích s ozonem vzrůstající polarita rozpouštědla podporuje reaktivitu. Již během své bakalářské práce¹⁴ jsem narazil na skupinu výše oxidovaných derivátů lupenu **60** - **62**, které byly inertní vůči působení ozonu ve směsi CHCl₃ s MeOH i za laboratorní teploty. Provedl jsem tedy pokus o jejich

ozonizaci v EtOAc za laboratorní teploty (schéma 17). K reakci však nedošlo, neboť dvojná vazba v těchto derivátech je zřejmě příliš silně deaktivována přítomnými oxoskupinami v konjugaci.

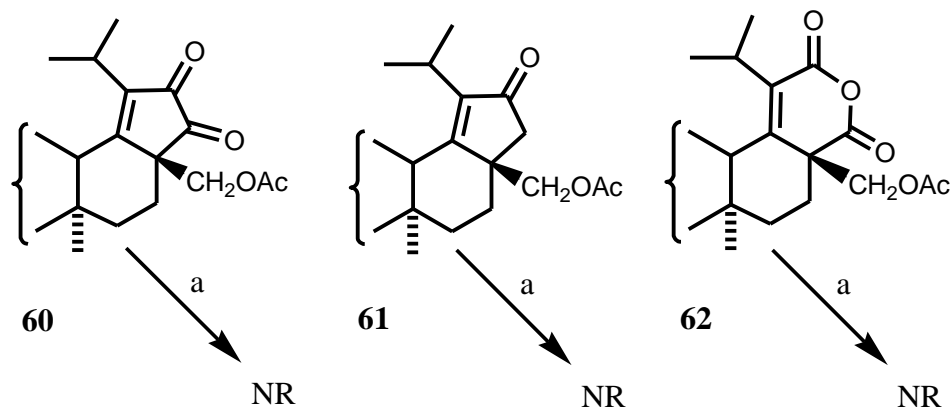


Schéma 17: a: O_3 / EtOAc (RT)

Z práce⁶³ také vyplývá, že polarita rozpouštědla by měla mít vliv též na složení produktů. Učinil jsem tedy několik pokusů o ozonizaci diacetátu **31** v nepolárních rozpouštědlech, kde by měl být preferován vznik ozonidu **33** oproti epoxidu **32b**.⁶³ Pro nízkou rozpustnost výchozího diacetátu **31** v nepolárních rozpouštědlech za nízkých teplot byla reakce provedena ve směsi cyklohexanu s toluenem (20 % obj. toluenu) při -35°C a v čistém hexanu při -15°C (schéma 18). Po separaci produktů pomocí HPLC však vyšlo najevo, že jejich poměr zůstal v obou případech stejný, 2:1 ve prospěch epoxidu **32b**. Doposud neznámá absolutní konfigurace na C-18,19 v ozonidu **33** byla nyní jednoznačně určena pomocí RTG difrakce připraveného monokrystalu.

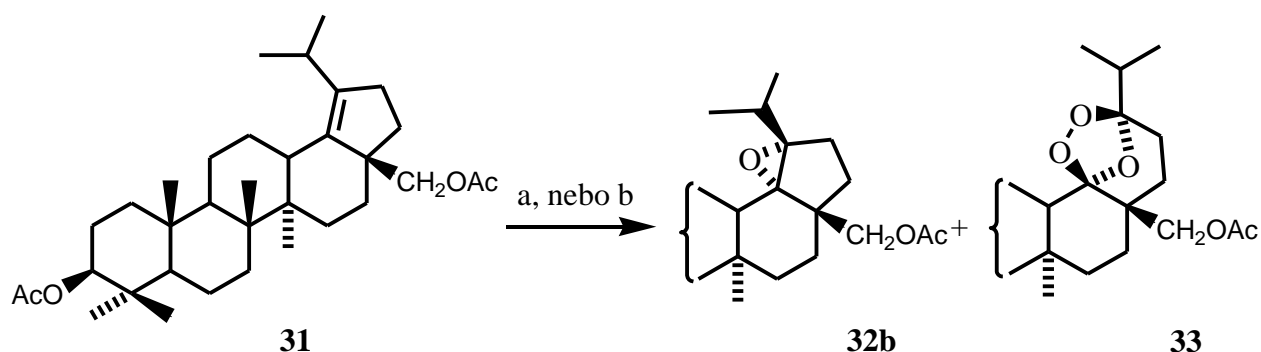


Schéma 18: a: O_3 / cyklohexan, toluen (-35°C); b: O_3 / hexan (-15°C)

3.2. Nenasycený aldehyd 63

První pokus o ozonizaci byl prováděn ve směsi CHCl_3 a MeOH za vzniku směsi velmi polárních produktů, jež s DMS zřejmě nereagovaly (dle TLC). Podle TLC bylo zřejmé, že jedním z produktů by mohla být karboxylová kyselina. Vzhledem k obtížné separovatelnosti terpenických kyselin byl surový produkt podroben reakci s CH_2N_2 , ale reakce nebyla pozorována. Směs se nepodařilo rozdělit.

Při dalším pokusu byla reakce prováděna pouze v CHCl_3 (schéma 19) a byla opět získána směs několika produktů. Dle TLC některé z produktů reagovaly s DMS, ale k výraznému zjednodušení směsi nedošlo. Rozdělením směsi na polární a nepolární produkty sloupcovou chromatografií a následnou separací méně polární frakce HPLC bylo izolováno 30 mg dosud nepopsané dinorkyseliny **IX**.

Struktura produktu byla navržena na základě spektrálních dat. V ^1H NMR spektru byl, kromě skeletálních signálů odpovídajících výchozí sloučenině **63**, přítomen signál vodíku na C-19 při $\delta \sim 2.47$ ppm a scházely signály aldehydového vodíku na C-29 a signály dvou vodíků na C-30. ^{13}C NMR spektrum pak obsahovalo signál COOH skupiny $\delta \sim 182.9$ ppm a celkem obsahovalo 30 signálů C. V IČ spektru byl nalezen pás $\text{C}=\text{O}$ vibrace $\nu \sim 1720\text{ cm}^{-1}$. V MS byl nalezen $\text{M}^+ = 474\text{ m/z}$ a dále ionty odpovídající $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$, $[\text{M} - \text{CH}_3\text{OH}]^+$.

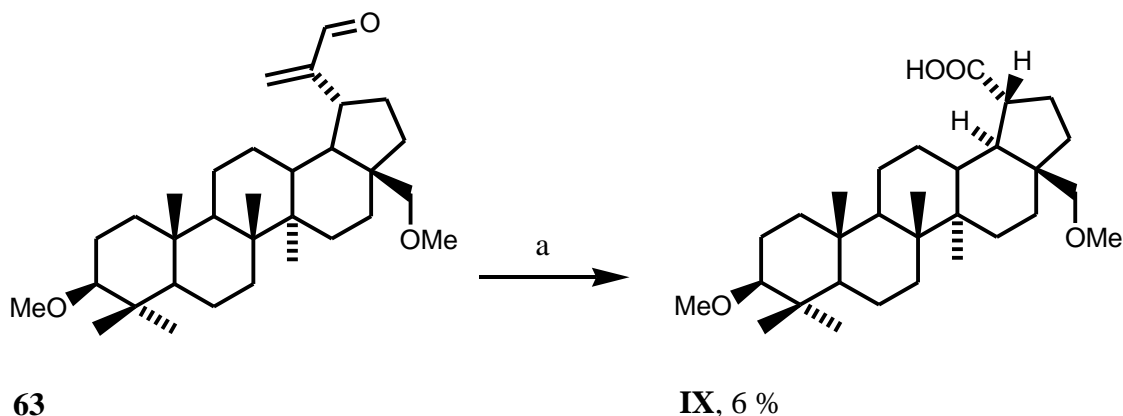


Schéma 19: a: 1. $\text{O}_3 / \text{CHCl}_3$ ($-78\text{ }^\circ\text{C}$), 2. DMS (RT)

Vznik kyseliny **IX** by bylo možné vysvětlit mnoha způsoby, ale vzhledem k tomu, že mechanismus reakce nebyl studován, jednalo by se o spekulace. Proto zde pouze shrnu poznatky z literatury^{47, 64-67} (schéma 20).

Již v roce 1931 bylo zjištěno,⁶⁴ že reakcí aldehydů s ozonem dochází ke vzniku peroxokyselin. Od té doby bylo publikováno několik studií,⁶⁵⁻⁶⁷ z nichž vyplývá, že produkty reakce aldehydu s ozonem mohou být též kyseliny, odpovídající alkoholy nebo chloridy kyselin (při reakci v chlorovaných rozpouštědlech). Po úvodní 1,3 – dipolární inzerce ozonu do C-H vazby dochází totiž k řadě navzájem konkurujících radikálových reakcí.⁶⁶ Závěry nabízející se na základě poznatků z literatury^{47, 64-69} jsou shrnuty ve schématu 20.

Je však možné, že kyselina **IX** vzniká způsobem zcela odlišným od způsobů zde navržených. Problematický by mohl být vznik enolformy **63c** vzhledem k sterické zábraně vodíků na C-12 lupanového skeletu.⁷⁰

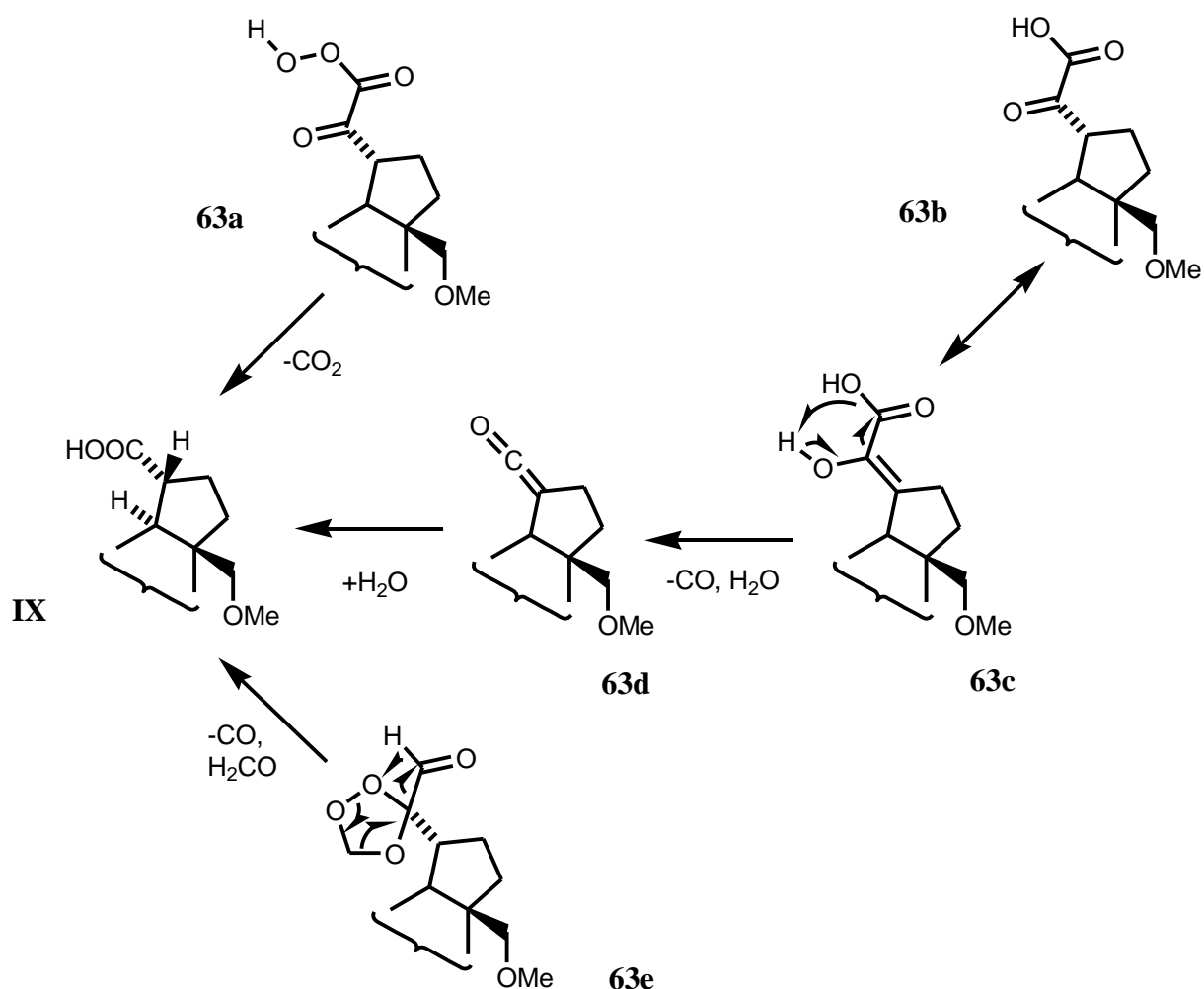


Schéma 20: Možné meziprodukty při vzniku kyseliny **IX**.

3.3. Kyselina ursolová (4) a její methylester II

Nejprve byla ozonizována čistá kyselina **4**. Po neúspěšném pokusu ve směsi CHCl_3 a MeOH byla reakce provedena znovu v čistém CHCl_3 . Při zpracování DMS nebyla pozorována žádná reakce (dle TLC). Byly přítomny 2 produkty. Při pokusu o jejich rozdělení pomocí HPLC vyšlo najevo, že se jedná o podstatně komplikovanější směs látek, z níž se podařilo izolovat pouze nenasycený keton **X**, již dříve popsany v literatuře⁷¹ (schéma 21). Jeho struktura byla navržena na základě spektrálních dat a následně potvrzena identitou ^1H NMR spektra s autentickým preparátem.⁷¹

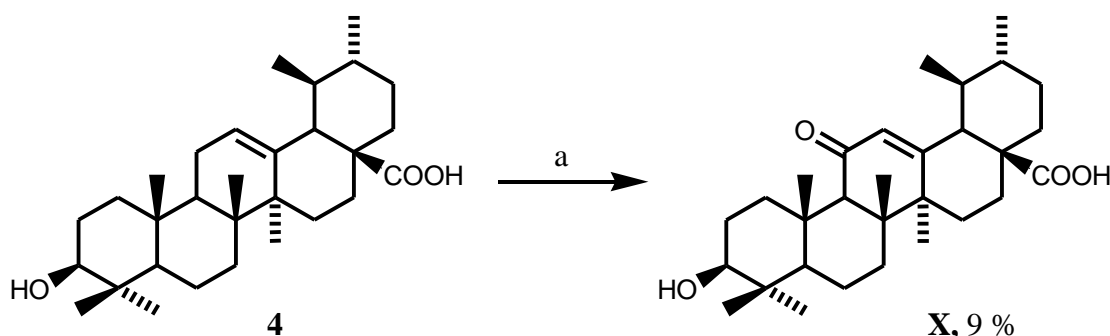


Schéma 21: a: 1. O_3 / CHCl_3 (-78°C), 2. DMS (RT)

Následoval pokus s methylesterem **II**. Ozonizace byla provedena v čistém CHCl_3 . Při pokusu s malým množstvím reakční směsi s DMS nebyla reakce dle TLC patrná, proto bylo od zpracování upuštěno. Dle HPLC chromatogramu bylo přítomno 6 píků (obrázek 1). Pomocí HPLC se podařilo izolovat čtyři látky v dostatečném množství pro charakterizaci (schéma 22). Jednalo se o dosud nepopsaný diketon **XI** a nepopsaný keton **XII** (na obrázku 1 jim odpovídají píky X1 a X4) a již dříve popsany⁷² keton **XIII** a diketon **XIV** (na obrázku 1 jim odpovídají píky X5 a X2).

HPLC frakce označená jako X3 (viz obrázek 1) je směs dvou látek v poměru téměř 1:1, což znemožňuje charakterizaci. Zároveň její množství nebylo dostatečné pro další separaci. Z NMR spekter vyplývá, že jeden z produktů je pravděpodobně 3,12-oxoderivát, druhý má na C-3 pravděpodobně též oxoskupinu. Nicméně jejich struktury nelze blíže určit. Frakce pracovně označená jako X6 je sice dobře patrná na chromatogramu, nicméně její hmotnost byla nízká. To mohlo být zapříčiněno neproporcionální odezvou refraktometrického detektoru.

Obrázek 1: HPLC chromatogram ozonizace methylesteru **II** (27 % obj. EtOAc v hexanu)

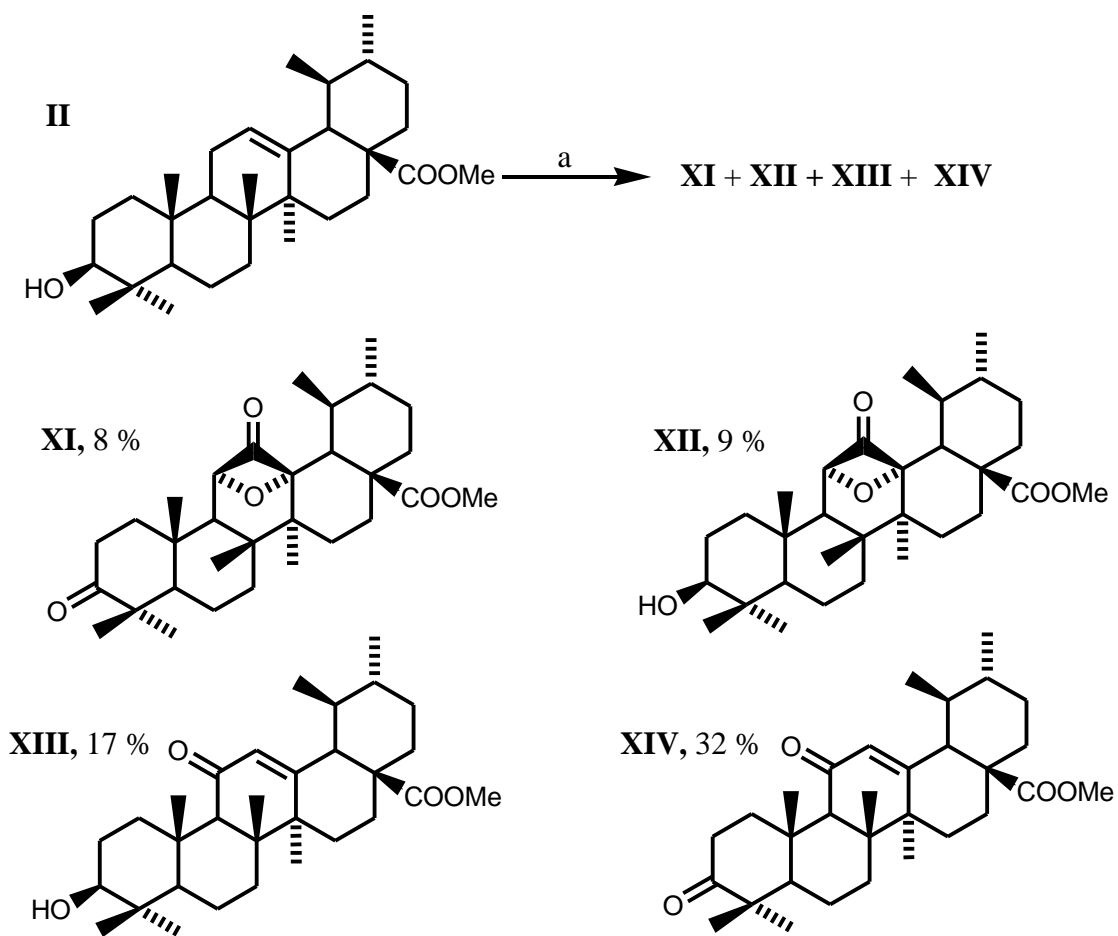
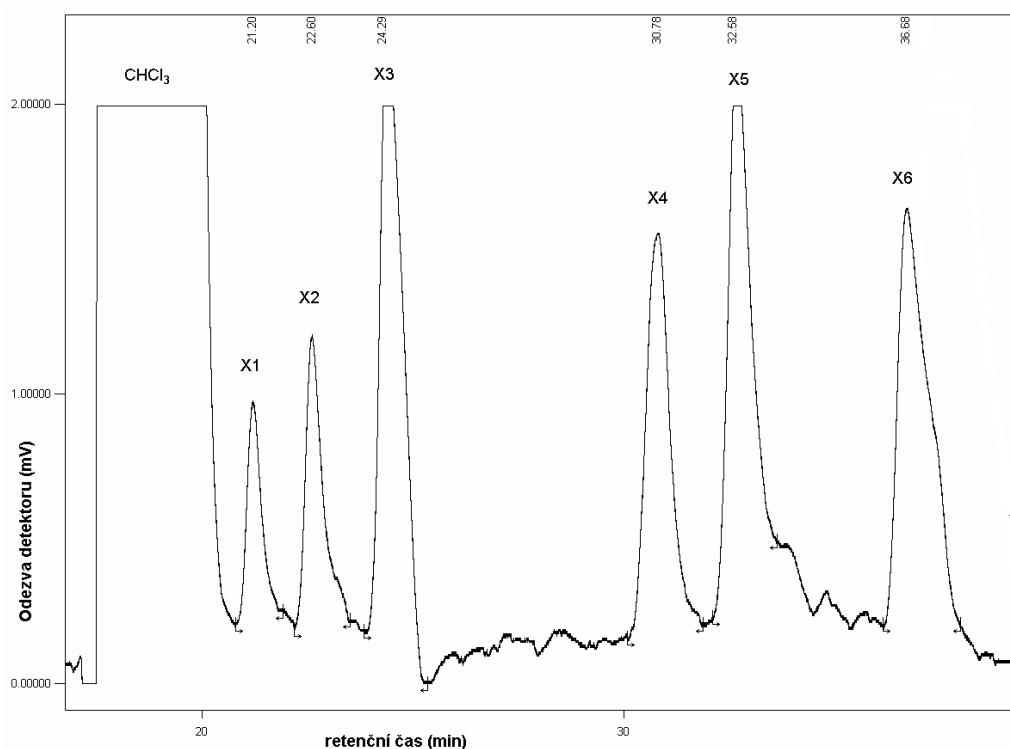


Schéma 22: a: 1. O_3 / $CHCl_3$ ($-78\text{ }^{\circ}C$),

Struktury produktů byly navrženy na základě spektrálních dat. U látek **XI**, **XII** již dříve popsaných byla struktura jednoznačně potvrzena identitou ^1H NMR spekter s literaturou.⁷² V případě sloučenin **XI** a **XII** byly struktury navrženy na základě 1D NMR spektrálních dat jako α -oxo ozonidy, které však nevyhovovaly MS a IČ spektrům. V IČ obou látek byly přítomny pásy vibrací $\nu \sim 1790\text{ cm}^{-1}$ odpovídající pětičlennému laktonu, nebo anhydridu a v MS obou látek nebyl přítomen patřičný M^+ odpovídající navrženým strukturám. Struktura diketonu **XI** byla objasněna až pomocí RTG difrakce připraveného monokrystalu. V případě ketonu **XII** byla struktura objasněna na základě 2D NMR spektroskopie a analogie NMR spekter s diketonem **XI**.

V ^1H NMR spektru diketonu **XI** nebyl přítomen signál H-3 α , navíc byl přítomen signál při $\delta \sim 2.5\text{ ppm}$ odpovídající dvěma vodíkům na C-2. V ^{13}C NMR spektru byly nalezeny signály $\delta \sim 112\text{ ppm}$ a $\delta \sim 95\text{ ppm}$ odpovídající uhlíkům C-12 a C-13. Dále byly nalezeny signály odpovídající karbonylovému uhlíku (C-12) při $\delta \sim 191\text{ ppm}$ a též signál C-3 při $\delta \sim 216\text{ ppm}$. IČ spektrum obsahovalo pásy C=O vibrací a navíc pás $\nu \sim 1790\text{ cm}^{-1}$ příslušící oxetanonovému kruhu. V MS pak byl nalezen molekulový iont $\text{M}^+ = 498\text{ m/z}$.

^1H NMR spektrum ketonu **XII** obsahovalo signály analogické s diketonem **XI** a navíc byl přítomen signál H-3 α při $\delta \sim 3.2\text{ ppm}$. V ^{13}C NMR spektru byly taktéž nalezeny signály analogické s diketonem **XI**, avšak scházel signál karbonylového uhlíku C-3. IČ spektrum obsahovalo pásy C=O vibrací a navíc pás $\nu \sim 1790\text{ cm}^{-1}$ příslušící oxetanonovému kruhu. V MS pak byl nalezen iont $\text{M}^+ = 500\text{ m/z}$.

Vznik 3-oxosloučenin **XI** a **XIV** je v souladu s poznatky o možné oxidaci sekundárních alkoholů ozonem.⁷³ Vznik C-12 ketonů **XI** a **XII** koresponduje s ozonizací methylesteru **III** (viz. 3.4). Obdobné deriváty (12-oxo) ursolové (**3**) a oleanolové (**7**) kyseliny jsou sice známy,^{72,74} ale přímou reakcí s ozonem byly získány poprvé. Celkový strukturní motiv oxetanonu ve sloučeninách **XI** a **XII** je sice znám na steroidech,⁷⁵ ale na triterpenech popsán dosud nebyl.

3.4. Kyselina oleanolová (**8**) a její methylester **III**

První pokus o ozonizaci kyseliny oleanolové (**8**) v EtOAc po zpracování DMS poskytl směs několika produktů polárnějších než výchozí kyselina. Pro snazší separaci bylo přistoupeno k methylaci surové reakční směsi CH_2N_2 , kdy byl pozorován vznik dvou produktů, jež se ale nepodařilo získat v čisté formě.

Druhý pokus byl proto proveden s methylesterem **III**. Ozonizace ve směsi CHCl_3 a MeOH a zpracování DMS vedlo ke vzniku dvou produktů s blízkým R_F . Vzhledem k přítomnosti MeOH se mohlo jednat o izomerní methoxyderiváty. Jejich separace se však nezdařila.

Při třetím pokusu bylo postupováno jako v předchozím odstavci, ale reakce byla prováděna v čistém CHCl_3 . V reakční směsi byl přítomen majoritní produkt, který po krystalizaci poskytl keton **XV** (schéma 23). Struktura produktu byla navržena na základě spektrálních dat a potvrzena shodou NMR spekter s autentickým preparátem.⁷²

Keton **XV** je v literatuře⁷² již popsán, nicméně ozonizací doposud připraven nebyl. Vzhledem k jednoduchosti, dobré výtěžnosti a snadnému zpracování reakce se jedná o výhodnou metodu pro přípravu 12-oxoderivátů kyseliny oleanové.

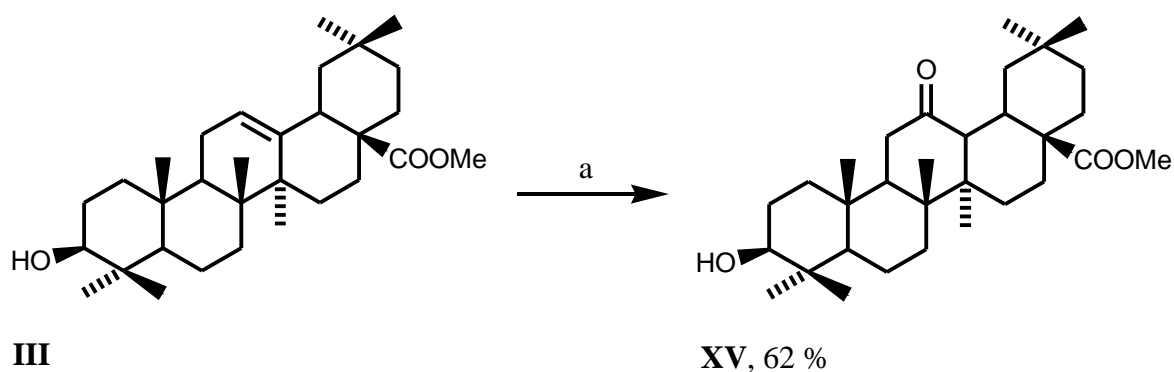


Schéma 23: a: 1. $\text{O}_3 / \text{CHCl}_3$ ($-78\text{ }^\circ\text{C}$), 2. DMS (RT)

3.5. Methylenketon V

Při ozonizaci methylenketonu **V** ve směsi CHCl_3 a MeOH byl pozorován vznik několika produktů, z nichž dva byly zastoupeny ve větší míře (dle TLC). Reduktivní zpracování reakční směsi DMS poskytlo směs produktů s blízkým R_F , které byly separovány pomocí HPLC. Vzhledem k obtížné separovatelnosti se podařilo izolovat pouze 30 mg enolformy diketonu **XVI** (schéma 24). V ^1H NMR byly nalezeny signály odpovídající tomuto typu skeletu, avšak scházel signál H-13 při $\delta \sim 2.5$ ppm. V ^{13}C NMR byly nalezeny signály při $\delta \sim 139$ ppm a $\delta \sim 142$ ppm odpovídající dvojně vazbě. Dále signál C-17 při $\delta \sim 193$ ppm. V IČ byly nalezeny dva pásy $\text{C}=\text{O}$ vibrací a pás $\text{O}-\text{H}$ vibrace. V MS byl nalezen molekulový iont $\text{M}^+ = 402$ m/z a dále ionty $[\text{M} - \text{CH}_3\text{OH}]^+$, $[\text{M} - \text{CH}_3\text{COOH}]^+$.

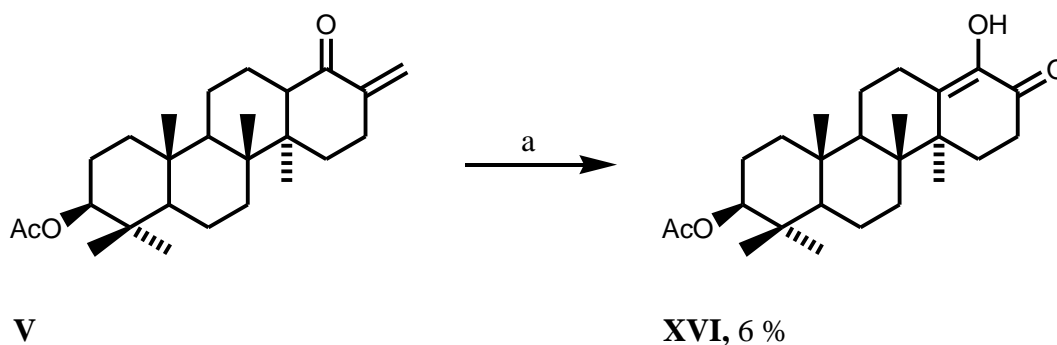


Schéma 24: a: 1. $\text{O}_3 / \text{CHCl}_3$, MeOH (-78°C), 2. DMS (RT)

Reakce byla provedena ještě jednou, pouze v CHCl_3 . Byla získána komplikovaná směs produktů, která byla na sloupci SiO_2 chromatograficky separována na polární a napolární podíl. Vzhledem k nízké hmotnosti napolárního podílu a komplikovanosti směsi byl dále studován pouze polární podíl. Jeho separace pomocí HPLC vedla k izolaci již známé³⁹ dikyseliny **XVII** a doposud nepopsaného monoethylesteru **XVIII**. Methylace polárního podílu a následná separace pomocí HPLC poskytla známý³⁹ dimethylester **XIX** (schéma 25).

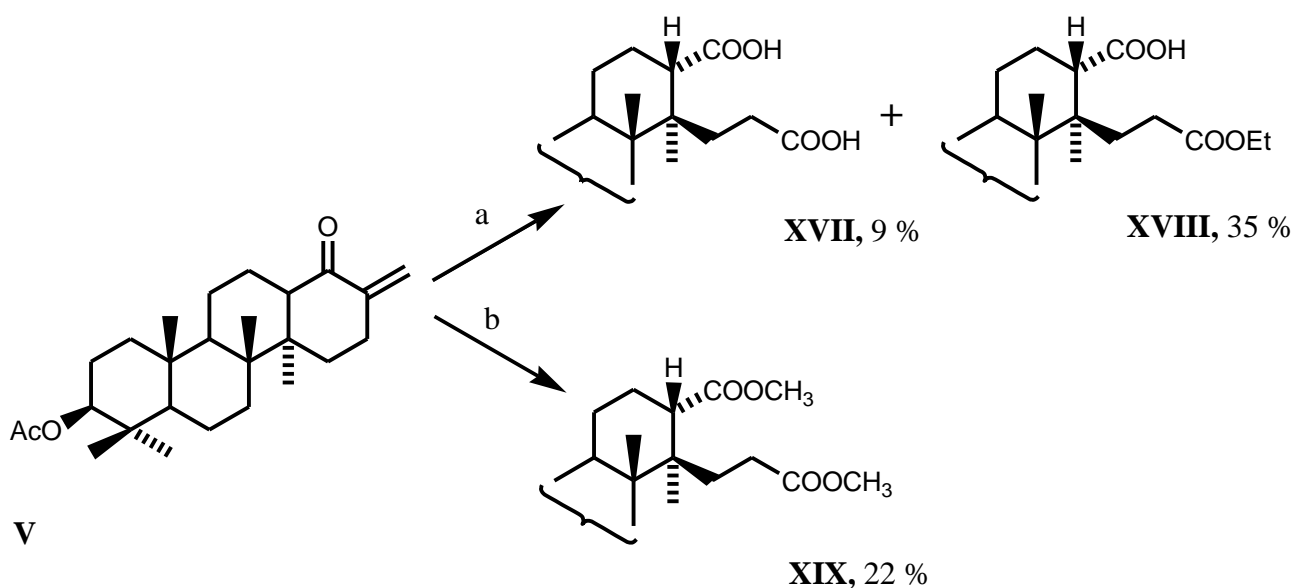


Schéma 25: a: 1. $\text{O}_3 / \text{CHCl}_3$ (-78°C), 2. DMS (RT)

b: 1. $\text{O}_3 / \text{CHCl}_3$ (-78°C), 2. DMS (RT), 3. CH_2N_2 , $\text{Et}_2\text{O} / \text{CHCl}_3$ (RT)

Struktura produktů **XVII** a **XIX** byla navržena na základě spektrálních dat a potvrzena shodou NMR spekter s autentickým preparátem.³⁹

Struktura produktu **XVIII** byla jednoznačně stanovena na základě spektrálních dat. V ^1H NMR byl kromě signálů odpovídajících volné kyselině **XVII** navíc přítomen kvartet dvou vodíků při $\delta \sim 4.09$ ppm s konstantou $J = 7.2$ Hz ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-$) a triplet tří vodíků při $\delta \sim 1.23$ ppm s konstantou $J = 7.1$ Hz ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-$). V ^{13}C NMR spektru byl pak přítomen odpovídající signál $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-$ při $\delta \sim 60.3$ ppm. V IČ byly nalezeny dva pásy odpovídající C=O vibraci při $\nu \sim 1697$ a 1732 cm^{-1} . V MS byl pak nalezen iont $\text{M}^+ = 464$ m/z a ionty odpovídající $[\text{M} - \text{CO}_2]^+$, $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$, $[\text{M} - \text{CH}_3\text{COOH} - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}]^+$.

Při první reakci (schéma 24) byla získána frakce jen o malé hmotnosti, pravděpodobně kvůli velmi polárním produktům, které se nepodařilo eluovat z kolony. To by vysvětlovalo malý výtěžek v případě produktu **XVI**. Je pravděpodobné, že při provedení reakce pouze v CHCl_3 (schéma 25) dochází k další oxidaci enolu **XVI** za vzniku dikyseliny **XVII**. Její methylace pak poskytla dimethylester **XIX**. Vznik monoethylesteru **XVIII** je neočekávaný, ale vysvětlitelný transesterifikací v průběhu HPLC EtOAc přítomným v mobilní fázi.

3.6. Aldehyd VI

Při reakci aldehydu **VI** s ozonem při nízké teplotě došlo pouze k částečné konverzi výchozího materiálu, zřejmě za vzniku norketonu **VIa**, který však nebyl izolován. Teprve po zahřátí na RT došlo k další reakci s ozonem. Reakční směs však nebylo možné separovat, neboť při RT docházelo k její degradaci za vzniku velmi komplikované směsi látek.

Pokus o ozonizaci aldehydu **VI** při RT vedl ke vzniku nedělitelné směsi produktů. Reakce byla proto provedena opět při $-78\text{ }^\circ\text{C}$ (schéma 26). Po zpracování DMS byla reakční směs odpařena a část byla separována na HPLC. Takto získaný meziprodukt byl norketon **VIa** jehož struktura byla potvrzena shodou ^1H NMR spektra s literaturou.⁷³ Jeho další ozonizací v CHCl_3 při RT byl získán surový nestabilní produkt, který se rozkládal při RT. Proto byla ihned po reakci změřena NMR spektra surového produktu. Očekávaným produktem měla být peroxykyselina **XX** (schéma 26), nicméně na základě HR-MS ESI bylo nutné její vznik vyloučit, neboť nebyl nalezen iont $\text{M}^+ = 474,3345$. Na základě NMR spekter nelze strukturu stanovit.

Z literatury⁶⁴⁻⁶⁷ je známo, že reakcí aldehydů s ozonem mohou vznikat peroxokyseliny, kyseliny a další produkty v závislosti na podmínkách. Pokus o přípravu kyseliny peroxoplatanové (**XX**) se nezdařil. Bezprostředně po reakci byl získán produkt

v čistotě dostatečné pro změření NMR spekter, avšak byl natolik nestabilní, že se rozkládal i za nízkých teplot v řádu hodin. Z těchto důvodů nebylo možné provést další měření potřebná k určení struktury.

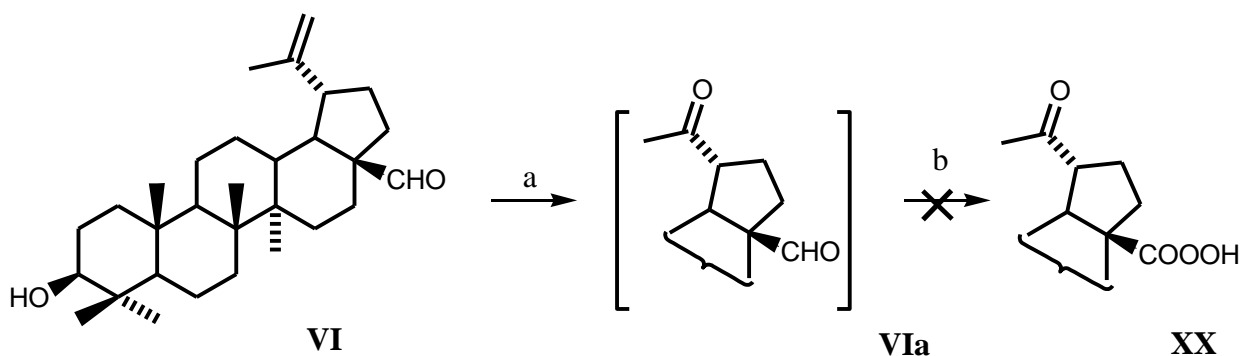


Schéma 26: a: $\text{O}_3 / \text{EtOAc}$ ($-78\text{ }^\circ\text{C}$); b: $\text{O}_3 / \text{CHCl}_3$ (RT)

3.7. Dien VII a trien VIII

Dien **VII** byl ozonizován v CHCl_3 při $-78\text{ }^\circ\text{C}$, a po zpracování DMS byla získána velmi komplikovaná směs produktů, kterou se nepodařilo rozdělit ani pomocí HPLC (schéma 27).

Trien **VIII** byl ozonizován v CHCl_3 při $-78\text{ }^\circ\text{C}$ tři hodiny, neboť reakce probíhala velmi pomalu. Byla získána směs produktů, která po zpracování DMS poskytla směs výrazně polárnějších produktů (schéma 27). Separace sloupcovou chromatografií nebyla úspěšná, byla získána pouze řada směsných frakcí, které se nezdařilo dále rozdělit.

Vzhledem k nedostatku výchozích látek **VII** a **VIII**, jejich obtížné přípravě a vzniku velice složitých směsí bylo od dalších pokusů upuštěno.

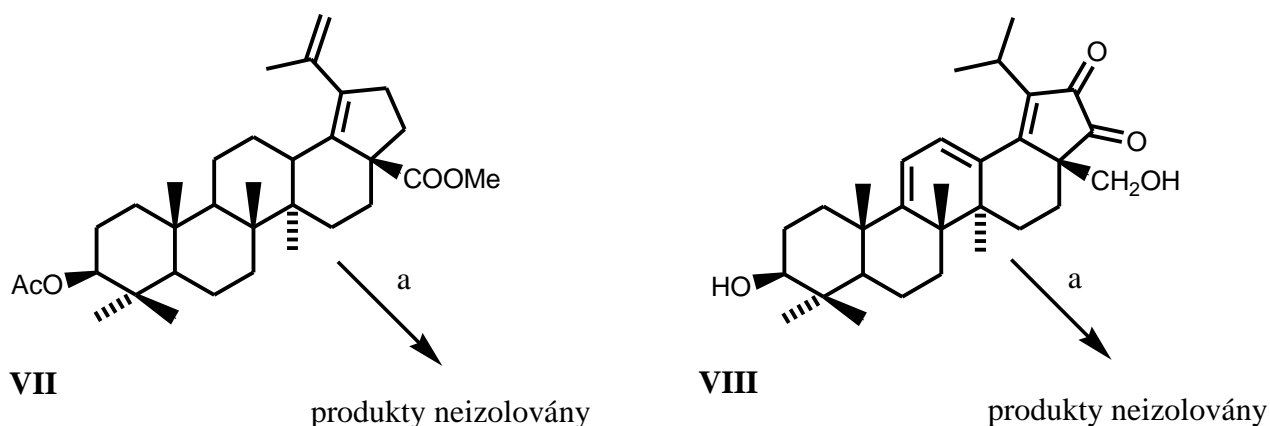


Schéma 27: a: 1. $\text{O}_3 / \text{CHCl}_3$ ($-78\text{ }^\circ\text{C}$), 2. DMS (RT)

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Obecné poznámky k experimentální části

Teploty tání byly stanoveny na bodotávku Büchi B-545 a nejsou korigovány.

Specifické optické otáčivosti byly měřeny v chloroformu na polarimetru AUTOMATIC POLARIMETER, Autopol III (Rudolph research, Flanders, New Jersey) a jsou uváděny v jednotkách [10^{-1} Deg $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$], koncentrace c [$\text{g}/100 \text{ ml}$] jsou udávány u každé hodnoty specifické optické otáčivosti.

IČ spektra byla měřena na spektrometru Nicolet Avatar 370 FTIR technikou DRIFT. Vlnočty jsou uvedeny v cm^{-1} .

NMR spektra byla měřena na přístroji Varian ^{UNITY}INOVA – 300 (^1H při 299.94 MHz, ^{13}C při 75.43 MHz), v případě ketonu **XII** na přístroji Bruker Avance ITM 500 (^1H při 499.95 MHz, ^{13}C při 125.73 MHz) v roztoku CDCl_3 . Pro ^1H NMR spektra byl jako vnitřní standard použit tetramethylsilan. Chemické posuny ^{13}C NMR spekter byly referencovány vůči $\delta(\text{CDCl}_3) = 77.00 \text{ ppm}$. Multiplicita signálů v ^{13}C NMR spektrech byla určena z DEPT spekter. Hodnoty chemických posunů (δ stupnice) a interakčních konstant (Hz) v ^1H NMR byly určeny pomocí analýzy prvního řádu. Chemické posuny byly zaokrouhleny na dvě desetinná místa, interakční konstanty na jedno místo.

Hmotnostní spektra EI-MS byla měřena na přístroji Shimadzu QP 2010, teplota iontového zdroje byla 150°C , zavedení vzorku bylo provedeno přímým vstupem na rheniovém drátku vyhřívaném elektrickým proudem (proud narůstal od 0 mA do 380 mA rychlostí 10 mA/s), energie ionizujících elektronů byla 75 eV. Relativní intenzity jsou vztaženy na nejintenzivnější ion v oblasti $m/z > 50$.

Průběh reakcí a čistota vzorků byla sledována pomocí TLC na fóliích Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck). Detekce TLC fólií byla prováděna nejprve UV zářením (model UVS – 54; 254 nm) a poté postřikem 10% kyselinou sírovou a zahřátím na $110 - 200^\circ\text{C}$.

Pro sloupcovou chromatografii byl používán Kieselgel 60 (63 – 200 μm ; Merck 7734). Mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii jsou uvedeny vždy u experimentu.

K odpařování rozpouštědel byla použita RVO (Büchi Rotovapor R-200).

Používaný HPLC systém měl následující uspořádání: vysokotlaké čerpadlo Gilson (model 321-322), nástřikový ventil RHEODYNE, preparativní HPLC předkolona (Labio 25x50 mm, sorbent Biospher Si 120, 7 μm), preparativní HPLC kolona (Labio 25x250 mm, sorbent Biospher Si 120, 7 μm), refraktometrický detektor IOTA 2 (PRECISION Instruments), propojený přes RS-232 s PC s programem Chromulan 1.20 a automatický

sběrač frakcí Gilson (model 206). Mobilní fáze pro HPLC jsou označeny čísly, které udávají objemové procento EtOAc v hexanu.

Ozon byl generován z nesusušeného vzduchu zionizátorem Azcozon VMUS-4 OZONE GENERATOR (AZCO INDUSTRIES LIMITED, G - Servis Praha spol. s r.o.) . Množství ozonu činilo 4 g/h při průtoku vzduchu 5 l/min (0,1 % ozonu v ozonizovaném vzduchu). Průtok vzduchu byl zajišťován akvarijním vzduchovacím motorkem TZ 604-00.

Chlazení roztoku během ozonizace bylo zajišťováno cryocoolerem Huber TC 100 E (Merci, s.r.o.), nebo ethanolem vychlazeným pomocí pevného CO₂.

Veškerá rozpouštědla používaná pro reakce, krystalizace a chromatografie byla předem destilována. DMS, KH₂PO₄ a TEMPO byl zakoupen od firmy Sigma-Aldrich, s.r.o., komerční chlornanové bělidlo (SAVO original) bylo zakoupeno v obchodním domě. Kyselina ursolová (**3**) a oleanolová (**7**) byly zakoupeny od firmy Kaden, Biochemicals GMBH. Výchozí látky **17**, **58**, **59**, **63** které nebyly připraveny v rámci této práce, jsou majetkem laboratoře RNDr. Jana Šarka, Ph.D.

Obecný postup ozonizace

Veškeré ozonizace triterpenoidů byly prováděny v digestoři (rovněž zpracování reakčních směsí) v roztoku chloroformu (pokud není uvedeno jinak; 150 ml na 1.5 mmol výchozí látky). Roztok byl vychlazen v ethanolické lázni na -78 °C a poté byl z ozonizátoru do roztoku zaváděn nesusušený ozonizovaný vzduch při průtoku 5 l/min (0.1 % ozonu v ozonizovaném vzduchu). Doba reakce byla různá podle množství ozonizované látky, obvykle 15 – 30 min na 1.5 mmol látky (kontrola pomocí TLC). Přebytný ozon byl odstraněn proudem vzduchu probublávaným reakční směsí po dobu alespoň 5 min.

Zpracování A

Redukční zpracování bylo prováděno přidavkem nadbytku DMS (2 ml na 1.5 mmol výchozí látky) do reakční směsi a ta byla za míchání ponechána vytemperovat na RT, (kontrola pomocí TLC). Reakční směs byla vytřepána vodou (3 x 25 ml) a rozpouštědla byla odpařena na RVO.

Zpracování B

Redukční zpracování nebylo prováděno, pouze byla odpařena rozpouštědla na RVO.

Obecný postup methylace karboxylových kyselin A

Výchozí kyselina (1.00 mmol) byla rozpuštěna v chloroformu (50 ml) a k tomuto roztoku byl přidáván roztok diazomethanu v diethyletheru, dokud byl pozorován vývin dusíku a reakční směs se odbarvovala. Nakonec byl přidán nadbytek diazomethanu (10 ml) a reakční směs byla ponechána stát 15 min. Kontrola pomocí TLC. Rozpouštědla byla odpařena na RVO.

Obecný postup methylace karboxylových kyselin B

Modifikovaný postup podle literatury.³⁹ K roztoku příslušné výchozí kyseliny (10.96 mmol) v DMF (50 ml) a MeCN (3,15 ml) byl přidán jemně rozetřený uhličitán draselný (1.60 g; 11.60 mmol). Roztok byl vychlazen na 0 °C ve vodní lázni s ledem a poté byl přidán methylbromid (32.88 mmol; 3.09 g) a reakce byla míchána při RT po několik hodin. Kontrola pomocí TLC. Po dokončení reakce byla do reakční směsi za stálého míchání opatrně přidána voda tak, aby došlo ke vzniku sraženiny. Vysrážený surový produkt byl odfiltrován na fritě S3, promyt vodou (třikrát 20 ml) a vysušen v sušárně při 80 °C. Pro případné další přečištění byla použita krystalizace z methanolu.

1. Izolace kyseliny betulinové (I)

Kyselina betulinová (I) byla izolována extrakcí vysušené platanové kůry (1.50 kg) methanolem a po odpaření rozpouštědel byla získána surová kyselina I (5.07 g; 0.3 %), která byla pro další reakce čištěna krystalizací z methanolu.⁴⁰ Kyselina I ve formě bílých krystalků měla t.t. 305.8 °C (MeOH), $[\alpha]_D +8$ (c 0.27). Literatura⁴⁰ udává t.t. 305 – 306 °C (MeOH), $[\alpha]_D +8$ (c 0.37; CHCl₃). ¹H NMR je shodné s autentickým preparátem.⁴⁰

2. Příprava methyl-ursolátu (II)

Podle obecného postupu methylace A byl z kyseliny ursolové (4) (530 mg; 1.16 mmol) reakcí s diazomethanem připraven methylester II (505 mg; 92 %) ve formě bílého prášku o t.t. 165.5 °C (MeOH), $[\alpha]_D +59$ (c 0.22). Literatura⁵⁸ udává t.t. 166-168 °C (aceton), $[\alpha]_D +61$ (c 19.8). ¹H NMR spektrum odpovídá literatuře.⁵⁸

Dále byl podle obecného postupu methylace B z kyseliny ursolové (**4**) (5.00 g; 10.96 mmol) připraven methylester **II** (4.64 g; 90 %), jehož ^1H NMR spektrum odpovídá literatuře.⁵⁸

3. Příprava methyl-oleanolátu (III)

Podle obecného postupu methylace A byl z kyseliny oleanolové (**8**) (254 mg; 0.56 mmol) reakcí s diazomethanem připraven methylester **III** (239 mg; 91 %) jako bílý prášek o t.t. 198.1 °C (MeOH), $[\alpha]_{\text{D}} +65.3$ (c 28.8). Literatura⁷⁷ uvádí t.t. 196-198 °C, $[\alpha]_{\text{D}} +70.1$. ^1H NMR spektrum odpovídalo literatuře.⁵⁹

Dále byl podle obecného postupu methylace B z kyseliny oleanolové (**8**) (2.19 g; 4.80 mmol) připraven methylester **III** (2.08 g; 92 %). ^1H NMR spektrum odpovídá literatuře.⁵⁹

4. Příprava methyl-betulinátu (IV)

Podle obecného postupu methylace B byl z kyseliny betulinové (**I**) (10.00 g; 21.91 mmol) připraven methylester **IV** (9.32 g; 90 %) jako bílý prášek o t.t. 223.2 °C (MeOH), $[\alpha]_{\text{D}} +9.7$ (c 0.30). Literatura⁴⁰ uvádí t.t. 222-225 °C (MeOH), $[\alpha]_{\text{D}} + 8$. ^1H NMR spektrum je shodné s autentickým preparátem.⁴⁰

5. Příprava methylenketonu V

Podle literárního postupu³⁹ byla β -ketokyselina **17** (1.54 g; 3.05 mmol) vysušena v exikátoru. K jejímu roztoku v CH_2Cl_2 (15 ml) byly přidány 2 ekvivalenty Et_3N (618 mg; 6.1 mmol) a reakční směs byla míchána přes noc při RT. Kontrola pomocí TLC (toluen: Et_2O = 8:1). Reakční směs byla zpracována přidáním vodného roztoku HCl (1:4) a extrahována CH_2Cl_2 . Spojené organické fáze byly poté vytřepány vodou do neutrální reakce. Organická fáze byla odpařena na RVO a surový produkt byl chromatografován na silikagelu (s gradientem mobilní fáze toluen: Et_2O od 15:1 do 8:1). Byl získán chromatograficky jednotný methylenketon **V** (904 mg; 74 %) jako bílý prášek o t.t. 268.6 °C, $[\alpha]_{\text{D}} +32$ (c 0.31). Literatura³⁹ uvádí t.t. 268 – 269 °C, $[\alpha]_{\text{D}} 32$ (c 0.37). ^1H NMR spektrum je shodné s autentickým preparátem.³⁹

6. Příprava aldehydu VI

Podle modifikovaného literárního postupu⁶⁰ byl betulin (**58**) (2.5 g; 5.64 mmol) navážen do baňky společně s TEMPO (150 mg; 0.96 mmol) a rozpuštěn v CH_2Cl_2 (38 ml).

Poté byl přidán vodný roztok KH_2PO_4 (38 ml; 7 g/l) a *t*-BuOH (38 ml). K tomuto roztoku byl za prudkého míchání přidán oxidační roztok, který byl tvořen z ředěného chlornanového bělidla (38 ml; bělidlo:voda = 1:1) a z vodného roztoku NaClO_2 (38 ml; 228 mg/ml). Reakční směs byla míchána přes noc při RT. Kontrola pomocí TLC (toluen: Et_2O = 8:1). Poté co bylo dosaženo úplné konverze byly vodná a organická fáze rozděleny a vodná fáze byla extrahována třikrát CH_2Cl_2 (50 ml). Spojené organické podíly byly poté vytřepány třikrát vodou (20 ml) a rozpouštědla byla odpařena na RVO. Zbytkový *t*-BuOH byl odstraněn odpařením na olejové vývěvě a surový produkt byl chromatografován na sloupci SiO_2 (s gradientem mobilní fáze od čistého toluenu po toluen: Et_2O = 10:1). Byl získán chromatograficky jednotný produkt **VI** (1.05 g; 42 %) ve formě světle hnědého prášku o t.t. 191.6 °C (aceton/MeOH), $[\alpha]_{\text{D}} +17.2$ (c 0.41). Literatura⁷⁸ uvádí t.t. 190 °C, $[\alpha]_{\text{D}} +19$. ^1H NMR spektrum odpovídá literatuře.⁶¹

7. Příprava dienu VII

Podle literárního postupu³⁹ byl výchozí methylester **IV** (7.00 g; 15.34 mmol) rozpuštěn v pyridinu (70 ml) a k roztoku byl přidán stejný objem Ac_2O . Reakční směs byla míchána při RT přes noc. Reakční směs byla nalita do dvojnásobného množství zředěné HCl (1:4) a extrahována dvakrát CHCl_3 . Spojené organické podíly byly promyty vodou do neutrální reakce a rozpouštědla byla odpařena na RVO. Takto získaný surový produkt (7.13 g; 94 %) byl použit do následujícího kroku.

Podle literatury¹³ byl k roztoku surového produktu acetylace v CHCl_3 (75 ml) v jedné dávce přidán roztok $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ (22.20 g; 69.38 mmol) v ledové kyselině octové (560 ml) a reakční směs byla refluxována 6 h. Po vychladnutí reakční směsi byl vysrážený octan rtuťnatý odfiltrován a poté byla k filtrátu přidána voda (1 l) a CHCl_3 (80 ml). Fáze byly odděleny a vodná fáze byla extrahována CHCl_3 (2 x 80 ml). Spojené organické podíly byly neutralizovány nasyceným roztokem NaHCO_3 na pH = 8 a rozpouštědla byla odpařena na RVO. Odparek byl rozpuštěn v Et_2O , byla přidána voda (5 ml), pyridin (5 ml) a roztok byl za míchání srážen nasyceným roztokem NaHS . Sraženina byla přefiltrována přes křemelinu a filtrát byl chromatografován na krátkém sloupci SiO_2 v toluenu. Po krystalizaci z isopropanolu byl získán dien **VII** (753 mg; 11 %) jako bezbarvé krystalky o t.t. 217.9 °C (butanon), $[\alpha]_{\text{D}} +56$ (c 0.23). Literatura¹³ uvádí t.t. 218 – 219 °C (butanon), $[\alpha]_{\text{D}} +57$ (c 0.270). ^1H NMR spektrum je shodné s autentickým preparátem.¹³

8. Příprava trienu VIII

Podle literárního postupu¹³ byl výchozí diketon **59** (1.05 g; 2.23 mmol) rozpuštěn v MeOH (20 ml). Po přidavku H₂O (200 µl) a koncentované HCl (35%; 3.50 ml) byla reakční směs za stálého míchání zahřívána na 50 °C po dobu 20 dnů. Kontrola pomocí TLC (toluen:Et₂O = 1:1) Reakční směs byla odpařena na RVO, odparek byl rozpuštěn v CH₂Cl₂ a promyt vodou (20 ml). Vodná fáze byla extrahována CH₂Cl₂ (2 x 20 ml). Po odpaření rozpouštědla na RVO byl surový produkt chromatografován na SiO₂ (toluen:Et₂O = 1:1). Takto byl získán chromatograficky jednotný trien **VIII** (323 mg; 31 %) jako oranžový prášek o $[\alpha]_D +1587$ (*c* 0.32), t.t. nebyla měřena, neboť se produkt rozkládá. Literatura³⁹ uvádí t.t. 122 – 135 °C za rozkl. (lyofilizát z *t*-BuOH), $[\alpha]_D +1591$ (*c* 0.73). ¹H NMR spektrum je identické s autentickým preparátem.¹³

9. Ozonizace ketonu 60

Ozonizace ketonu **60** (550 mg; 1.02 mmol) byla prováděna v EtOAc za RT, jinak bylo postupováno podle obecného postupu ozonizace se zpracováním B. Při kontrole reakce pomocí TLC (hexan:EtOAc = 1:1) byla pozorována přítomnost pouze výchozí sloučeniny.

10. Ozonizace diketonu 61

Ozonizace diketonu **61** (510 mg; 0.92 mmol) byla prováděna v EtOAc za RT, jinak bylo postupováno podle obecného postupu ozonizace se zpracováním B. Při kontrole reakce pomocí TLC (toluen:Et₂O = 6:1) byla pozorována přítomnost pouze výchozí sloučeniny.

11. Ozonizace anhydridu 62

Ozonizace ketonu **62** (260 mg; 0.46 mmol) byla prováděna v EtOAc za RT, jinak bylo postupováno podle obecného postupu ozonizace se zpracováním B. Při kontrole reakce pomocí TLC (toluen:Et₂O = 10:1) byla pozorována přítomnost pouze výchozí sloučeniny.

12. Ozonizace diacetátu 31

Ozonizace diacetátu **31** (250 mg; 0.47 mmol) byla prováděna ve směsi cyklohexanu s toluenem (20 % toluenu) při teplotě -35 °C, jinak bylo postupováno podle obecného postupu ozonizace se zpracováním A. Reakce byla sledována pomocí TLC

(toluen:Et₂O = 10:1). Produkty byly separovány pomocí HPLC (mobilní fáze 14) a lyofilizovány z *t*-BuOH. Takto byl získán epoxid **32b** (119 mg; 44 %) jako bílý lyofilizát o t.t. 207.8 °C (lyofilizát z *t*-BuOH), [α]_D = +37 (c 0.24). Literatura⁵⁴ uvádí t.t. 210 °C, [α]_D = + 36.6. ¹H NMR spektrum je shodné autentickým preparátem.¹⁴ Dále byl získán ozonid **33** (63 mg; 23 %) jako bílý lyofilizát o t.t 161.5 °C (lyofilizát z *t*-BuOH), [α]_D +16 (c 0.22). Literatura¹⁴ uvádí t.t 161 °C, [α]_D +15 (c 0.21). ¹H NMR spektrum je shodné autentickým preparátem.¹⁴

Dále byl ozonizován diacetát **31** (250 mg; 0.47 mmol) v hexanu při teplotě -15 °C, jinak bylo postupováno stejně jako v předchozím případě. Takto byl získán epoxid **32b** (106 mg; 39 %) a ozonid **33** (50 mg; 18 %). ¹H NMR spektra obou produktů jsou shodná s autentickými preparáty.¹⁴

13. Ozonizace nenasyčeného aldehydu **63**

Podle obecného postupu ozonizace (s přidavkem 20 ml MeOH) se zpracováním A byl ozonizován surový aldehyd **63** (530 mg; 1.09 mmol) za vzniku velmi komplikované směsi produktů. Reakce byla průběžně sledována pomocí TLC (toluen:Et₂O = 10:1). Rozpouštědla byla odpařena na RVO a odparek byl methylován diazomethanem podle obecného postupu methylace A. Dle TLC však k reakci zřejmě nedošlo. Směs byla chromatografována na sloupci SiO₂ (s gradientem mobilní fáze od čistého toluenu po toluen:Et₂O = 10:1), ale byly získány pouze směsné frakce dále nedělitelné. Od dalších pokusů o separaci produktů bylo proto upuštěno.

Aldehyd **63** (515 mg; 1.06 mmol) byl znovu ozonizován podle obecného postupu ozonizace (bez MeOH) se zpracováním A a opět byla získána komplikovaná směs produktů. Podle TLC (toluen:Et₂O = 10:1) některé z produktů reagovaly s DMS (zpracování ozonizace A) a byly patrné dvě frakce produktů: frakce 1 (velmi polární) a frakce 2 (méně polární). Frakce byly rozděleny chromatografií na SiO₂ (toluen:Et₂O = 10:1) a frakce 2 byla dělena pomocí HPLC (mobilní fáze 22). Takto se podařilo získat kyselinu **IX** (30 mg; 6 %) jako bílý prášek o t.t. = 215.2 °C (CHCl₃/MeOH), [α]_D -7.7 (c 0.28). IČ spektrum: 1721 (C=O). ¹H NMR spektrum (CDCl₃, 299.9 MHz): 0.75 s, 3 H; 0.83 s, 3 H; 0.96 s, 3 H; 0.98 s, 3 H; 1.03 s, 3 H (5 × CH₃); 2.47 td, 1 H (*J*₁ = 10.8 Hz, *J*₂ = 6.0 Hz, H-19β); 2.64 m, 1 H (Σ*J* = 15.9 Hz, H-3α); 2.96 d, 1 H (*J* = 9.3 Hz, H-28a); 3.33 s, 3 H; 3.35 s, 3 H (2 × OCH₃); 3.42 d, 1 H (*J* = 9.3 Hz, H-28b). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.42 MHz): 14.60, 15.90, 16.00, 16.14, 18.16, 20.78, 22.21, 26.00,

27.10, 27.99, 28.85, 29.71, 34.10, 34.70, 36.42, 37.20, 38.60, 38.80, 40.82, 42.47, 44.09, 47.11, 50.16, 51.23, 55.82, 57.54, 59.65, 71.48, 88.59, 182.86. MS, m/z (%): [Pro C₃₀H₅₀O₄ M⁺ 474], 474 (30), 456 (12), 442 (100), 397 (63), 221 (77), 189 (93).

14. Ozonizace kyseliny ursolové (4) a jejího methyl-esteru II

Kyselina **4** (507 mg; 1.08 mmol) byla ozonizována podle obecného postupu ozonizace se zpracováním A. Dle TLC (hexan: EtOAc = 6:1; 3 × vyvíjeno) reakce s DMS neprobíhala. Byla získána komplikovaná směs produktů, z níž se po separaci pomocí HPLC (mobilní fáze 40) a lyofilizaci z *t*-BuOH podařilo izolovat nenasycený keton **X** (45 mg; 9 %) jako bílý lyofilizát o t.t. 253.6 °C (lyofilizát z *t*-BuOH), $[\alpha]_D + 56.6$ (c 0.32). IČ spektrum: 1659 (C=C), 1689 (C=O), 2616 (COO-H). ¹H NMR spektrum (CDCl₃, 299.9 MHz): 0.79 s, 3 H; 0.88 d, 3 H (*J* = 6.3 Hz); 0.98 d, 3 H (*J* = 6.8 Hz); 0.99 s, 3 H; 0.99 s, 3 H; 1.12 s, 3 H; 1.33 s, 3 H (7 × CH₃); 2.10 dt, 1 H (*J*₁ = 13.2 Hz, *J*₂ = 4.2 Hz, H-15b); 2.34 s, 1 H (H-9); 2.40 d, 1 H (*J* = 11.4 Hz, H-18); 2.73 dt, 1H (*J*₁ = 13.5 Hz, *J*₂ = 3.6 Hz, H-15a); 3.20 dd, 1 H (*J*₁ = 11.4 Hz, *J*₂ = 4.8 Hz, H-3α); 5.58 s, 1 H (H-12). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.42 MHz): 15.25, 15.84, 16.66, 17.13, 18.43, 20.56, 20.56, 23.57, 26.44, 27.67, 28.11, 30.05, 32.83, 35.75, 36.87, 38.30, 38.41, 38.78, 38.95, 43.67, 44.46, 47.03, 52.65, 54.72, 61.26, 78.17, 130.04, 164.28, 179.16, 200.80. MS, m/z (%): [Pro C₃₀H₄₆O₄ M⁺ 470], 470 (52), 455 (11), 427 (16), 303 (100), 262 (69).

Methyl-ester **II** (1.53 g, 3.26 mmol) byl ozonizován podle obecného postupu ozonizace se zpracováním B. Reakce malého množství reakční směsi s DMS dle TLC (PhMe:Et₂O = 10:1; 5 × vyvíjeno) neprobíhala, proto od ní bylo upuštěno (zpracování B). Byla získána komplikovaná směs látek, která byla dělena pomocí HPLC (fáze 27). Takto se podařilo získat frakce X1 a X2, směsnou frakci X3, čisté frakce X4 a X5 a frakci X6. Frakce X1 a X2 byly sebou vzájemně znečištěny, proto byly spojeny a rozděleny pomocí HPLC (mobilní fáze 17) na čisté frakce X1 a X2. Frakce X6 byla kvůli nečistotám opět dělena HPLC (mobilní fáze 19), nicméně nebyla získána v dostatečném množství a čistotě. Po lyofilizaci z *t*-BuOH se tedy podařilo získat ketony **XI** a **XII** (frakce X1 a X4), nenasycené ketony **XIII** a **XIV** (frakce X2 a X5).

Dioxoderivát **XI** (125 mg; 8 %) ve formě bílého lyofilizátu měl t.t. 155.4 °C (lyofilizát z *t*-BuOH), $[\alpha]_D + 120.4$ (c 0.36). IČ spektrum: 1699, 1790 (2 × C=O), 1727 (C=OOCH₃). ¹H NMR spektrum (CDCl₃, 299.9 MHz): 0.96 d, 3 H (*J* = 6 Hz); 1.04 s, 3 H; 1.05 s, 3 H; 1.09 s 3 H; 1.15 d, 3 H (*J* = 6 Hz); 1.16 s, 3 H (7 × CH₃); 2.27 s, 1 H (H-9);

2.53 td 1H ($J_1 = 13.8$, $J_2 = 4.5$, H-15 β); 2.53 m, 2H ($\Sigma J = 12.3$, H-2); 2.57 d, 1 H ($J = 10.2$ Hz, H-18); 3.77 s, 3 H (COOCH₃); 4.83 s, 1 H (H-12). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.42 MHz): 19.55, 19.60, 19.71, 19.98, 20.44, 21.23, 21.26, 24.35, 26.79, 26.81, 29.14, 33.37, 34.97, 34.85, 36.64, 39.07, 39.16, 39.41, 42.26, 46.33, 46.94, 47.27, 47.69, 51.78, 54.05, 59.69, 95.25, 113.11, 177.27, 191.15, 216.70. MS, m/z (%): [Pro C₃₁H₄₆O₇ M⁺ 498], 498 (7), 483 (3), 470 (53), 411 (20), 252 (42), 193 (100).

Keton **XII** (141 mg; 9 %) ve formě bílého lyofilizátu měl t.t. 151.3 °C (lyofilizát z *t*-BuOH), $[\alpha]_D + 48.9$ (c 0.32). IČ spektrum: 1722, 1793 (2 \times C=O). Přiřazení signálů v ¹H a ¹³C NMR bylo provedeno na základě experimentů COSY, HSQC, HMBC a ROESY (viz přílohy). ¹H NMR spektrum (CDCl₃, 500.0 MHz): 0.77 s, 3 H (H-24); 0.96 d, 3 H ($J_{30-20} = 6.3$ Hz, H-30); 0.97 s, 3 H (H-23); 0.98 s, 3 H (H-25); 1.14 bs, 3 H (H-26); 1.15 d, 3 H ($J_{29-19} = 6.3$ Hz, H-29); 1.32 bs, 3 H (H-27) (7 \times CH₃); 2.16 s, 1 H (H-9); 2.51 td, 1 H ($J_{15\beta-16\alpha} 13.7$, $J_{15\beta-16\beta} = 4.6$, H-15 β); 2.55 dd, 1 H ($J_{18-19} = 11.1$, $J_{e.r.} = 1.4$, H-18); 3.23 dd, 1 H ($J_{3-2a} = 11.5$, $J_{3-2b} = 4.7$, H-3 α); 3.77 s, 3 H (COOCH₃); 4.83 s, 1 H (H-11). ¹³C NMR (CDCl₃, 125.7 MHz): 15.03 (C-24), 18.37 (C-6), 19.6 (C-27), 20.96 (C-29), 20.31 (C-25), 21.24 (C-30), 21.65 (C-26), 24.41 (C-16), 26.82 a 26.89 (C-2 a C-15), 27.67 (C-23), 29.12 (C-21), 35.74 (C-7), 36.24 (C-10), 36.61 (C-22), 38.79 (C-1), 38.96 (C-4), 39.02 a 39.13 (C-19 a C-20), 42.5 (C-14), 46.28 (C-18), 46.74 (C-8), 47.70 (C-17), 51.80 (OCH₃), 55.09 (C-5), 60.58 (C-9), 78.59 (C-3), 95.36 (C-11), 112.84 (C-13), 177.34 (C-28), 191.62 (C-12). MS, m/z (%): [Pro C₃₁H₄₈O₇ M⁺ 500], 500 (2), 472 (43), 457 (5), 413 (15), 252 (61), 193 (100).

Keton (258 mg; 17 %) **XIII** ve formě bílého lyofilizátu měl t.t. 159.1 °C (lyofilizát z *t*-BuOH), $[\alpha]_D + 78$ (c 0.23). Literatura⁷⁹ uvádí t.t. 150 - 159 °C. ¹H NMR spektrum je identické s literaturou.⁷²

Diketon (483 mg; 32 %) **XIV** ve formě bílého lyofilizátu měl t.t. 223.7 °C (lyofilizát z *t*-BuOH), $[\alpha]_D + 104.5$ (c 0.27). Literatura⁸⁰ uvádí t.t. 166 - 166.5 °C, $[\alpha]_D + 109.1$. ¹H NMR spektrum je identické s literaturou.⁷²

15. Ozonizace kyseliny oleanolové (**8**) a jejího methyl-esteru **III**

Kyselina **8** (510 mg; 1.12 mmol) byla ozonizována v EtOAc podle obecného postupu ozonizace. Byla získána směs několika polárních látek, která po zpracování DMS (postup zpracování A) a methylací CH₂N₂ (obecný postup methylace A) poskytla 2 produkty (dle TLC, toluen:EtOAc = 4:1) s R_F blízkými výchozí kyselině **8**. Po sloupcové

chromatografii na SiO₂ (hexan:EtOAc = 4:1) byly však získány pouze směsné frakce. Od dalšího dělení bylo upuštěno a bylo přistoupeno k ozonizaci methyl-esteru **III**.

Methyl-ester **III** (254 mg; 0.54 mmol) byl ozonizován podle obecného postupu ozonizace. Dle TLC (toluen:Et₂O = 6:1) byl přítomen jeden produkt, poněkud více polární než výchozí methylester **III**. Zpracování DMS podle obecného postupu A a následná krystalizace ze směsi MeOH/aceton poskytla 12-oxo derivát **XV** (163 mg; 62 %) ve formě bezbarvých až bělavých krystalků o t.t. 197.7 °C (aceton/MeOH), [α]_D -14.5 (c 0.25). Literatura⁸¹ uvádí t.t. 170 - 172 °C, [α]_D -59.4. ¹H NMR spektrum je identické s literaturou.⁷²

Methyl-ester **III** (1.02 g; 2.17 mmol) byl ozonizován ještě jednou podle výše uvedeného postupu. Byl získán 12-oxoderivát **XV** (883 mg; 84 %). ¹H NMR spektrum je identické s literaturou.⁷²

16. Ozonizace methylenketonu **V**

Methylenketon **V** (516 mg; 1.29 mmol) byl ozonizován v přítavku MeOH (20 ml) podle obecného postupu ozonizace za vzniku směsi látek s R_F blízkým (dle TLC, toluen:Et₂O = 10:1) výchozímu methylenketonu **V**. Zpracování DMS (postup A) vedlo ke vzniku směsi polárnějších produktů, které byly děleny pomocí HPLC (fáze 25). Z komplikované směsi se podařilo získat nenasycený alkohol **XVI** (30 mg; 6 %) jako bílý prášek o t.t. 196.2 °C (CHCl₃/MeOH), [α]_D +12.1 (c 0.30). IČ spektrum: 1705, 1732 (2 × C=O), 2624 (O-H). ¹H NMR spektrum (CDCl₃, 299.9 MHz): 0.86 s, 2 × 3H; 0.89 s, 3 H; 0.94 s, 3H; 0.96 s, 3 H (5 × CH₃); 2.06 s, 3 H (CH₃COO); 4.54 m, 1H (ΣJ = 24 Hz, H-3α). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.42 MHz): 16.37, 16.63, 17.98, 18.37, 18.50, 20.16, 21.26, 22.98, 23.55, 27.18, 28.02, 32.01, 34.23, 37.33, 37.72, 38.58, 41.04, 43.73, 49.90, 55.31, 80.62, 138.92, 142.34, 170.98, 193.17. MS, m/z (%): [Pro C₂₅H₃₈O₄ M⁺ 402], 402 (8), 342 (6), 299 (4), 189 (37), 43 (100).

Methylenketon **V** (2.49 g; 6.23 mmol) byl znovu ozonizován (bez přítavku MeOH) podle obecného postupu ozonizace se zpracováním B (bez DMS). Byla získána směs velmi polárních látek. Pokus o sloupcovou chromatografii na SiO₂ (s gradientem mobilní fáze od čistého toluenu po toluen:Et₂O = 10:1; polární produkty eluovány čistým Et₂O) nevedl k rozdělení směsi. Podařilo se získat směsné frakce (500 mg) nepolárních produktů, dále nedělitelné, a frakci (2 g) polárních produktů. Část polární frakce byla methylována CH₂N₂ podle obecného postupu methylace. Methylovaný i nemethylovaný podíl byl dělen pomocí

HPLC (fáze 85 a fáze 50) a po lyofilizaci z *t*-BuOH byla získána dikyselina **XVII**, její monoethylester **XVIII** a dimethylester **XIX**.

Monoethylester **XVIII** (520 mg; 35 %) jako bílý lyofilizát měl t.t. 219.5 °C (lyofilizát z *t*-BuOH) a $[\alpha]_D +10.6$ (c 0.34). IČ spektrum: 1726, 1732, 1734 (3 × C=O). ¹H NMR spektrum (CDCl₃, 299.9 MHz): 0.84 s, 3 H; 0.85 s, 3 H; 0.87 s, 3 H; 1.01 s, 3 H; 1.07 s, 3 H (5 × CH₃); 1.23 t, 3 H (*J* = 7.1, CH₃CH₂O); 2.05 s, 3 H (OCOCH₃); 2.64 m, 1 H (Σ*J* = 18 Hz, H-13β); 4.09 q, 2 H (*J* = 7.2 CH₃CH₂CO); 4.47 dd, 1 H (*J*₁ = 10.8 Hz, *J*₂ = 5.4 Hz, H-3α). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.42 MHz): 13.19, 14.20, 15.61, 16.46, 18.10, 20.04, 21.27, 23.61, 25.97, 27.84, 30.34, 30.82, 33.89, 37.24, 37.73, 42.15, 42.22, 48.16, 50.84, 55.32, 60.29, 80.70, 171.05, 174.27, 181.19. MS, *m/z* (%): [Pro C₂₅H₃₈O₄ M⁺ 464], 464 (1), 446 (2), 420 (2), 404 (39), 389 (10), 371 (7), 361 (18), 331 (11), 317 (9), 189 (72), 43 (100).

Dikyselina **XVII** (221 mg; 9 %) jako bílý lyofilizát měla t.t. 258.3 °C (lyofilizát z *t*-BuOH) a $[\alpha]_D +5.3$ (c 0.35). Literatura³⁹ uvádí t.t. 252 – 254 °C (rozkl.), $[\alpha]_D -1$ (c 0.56; dioxan). ¹H NMR spektrum je identické s autentickým preparátem.³⁹

Dimethylester **XIX** (553 mg; 22 %) jako bílý lyofilizát měl t.t. 144.3 °C (lyofilizát z *t*-BuOH) a $[\alpha]_D +20.4$ (c 0.29). Literatura⁸² uvádí t.t. 140 – 144 °C (rozkl.), $[\alpha]_D +12.2$ (c 1; CHCl₃). ¹H NMR spektrum je identické s literaturou.⁸²

ZÁVĚR

V rámci této práce byla provedena řada reakcí, které většinou nevedly k očekávatelným produktům. Separace produktů ze směsí byly velmi komplikované a bez preparativního HPLC ve většině případů neproveditelné. Vzhledem ke komplikovanosti reakčních směsí bylo nutné nasazovat do reakcí velká množství výchozích látek, aby byly produkty získány v dostatečném množství pro charakterizaci. To kladlo větší nároky na přísuny výchozích látek a na čas potřebný k separaci reakčních směsí pomocí HPLC. Taktéž charakterizace některých produktů byla komplikovaná – zejména v případě derivátů **XI** a **XII** s oxetanonovým kruhem, jejichž signály v 1D NMR spektrech velmi dobře vyhovovaly též α -oxo ozonidům.

Výsledky dosažené v této práci jsou stručně shrnuty v následujících bodech:

1. Byla provedena literární rešerše ozonizací triterpenoidů.
2. Byly syntetizovány, nebo izolovány z přírodního materiálu tyto olefiny: kyselina betulínová (**I**), methylestery **II**, **III**, **IV**, methylenketon **V**, aldehyd **VI**, dien **VII** a trien **VIII**.
3. Byl studován vliv polarity rozpouštědla na průběh ozonizace sloučenin **31**, **60**, **61** a **62**.
4. Byla provedena ozonizace následujících olefinů: aldehyd **63**, kyseliny **3** a **7**, methylestery **II** a **III**, methylenketon **V**, aldehyd **VI**, dien **VII** a trien **VIII**.
5. Bylo připraveno a plně charakterizováno pět nových sloučenin: kyselina **IX**, diketon **XI**, keton **XII**, nenasycený alkohol **XXVI** a monoethylester **XVIII**.
6. Byla určena absolutní konfigurace ozonidu **33** RTG difrakcí připraveného monokrystalu. Dále byla RTG difrakcí připravených monokrystalů ověřena struktura dienu **VII** a stanovena struktura diketonu **XI**.
7. Veškeré produkty ozonizací jsou v současnosti testovány na *in vitro* cytotoxickou aktivitu vůči buněčné linii CEM metodou MTT testu v Laboratoři experimentální medicíny FN Olomouc.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Newman D. J., Cragg G. M., Sander K. M.: *Nat. Prod. Rep.*, **17**, 215 (2000).
2. Hajdúch M., Džubák P., Šarek J.: *Klin. Farmakol. Farm.*, **18**, 14 (2004).
3. Džubák P., Šarek J., Cwiertka K., Hajdúch M., Vydra D.: *Klin. Farmakol. Farm.*, **18**, 96 (2004).
4. Mukherjee R., Kumar V., Srivastava S. K., Agarwal S. K., Burman A. C.: *Anticancer Agents Med. Chem.*, **6**, 271 (2006).
5. Wang G., Tang W., Bidigare R. R.: *Nat. Prod.*, **68**, 197 (2005).
6. Li F., Goila-Gaur R., Salzwedel K., Kilgore N. R., Reddick M., Matallana C., Castillo A., Zoumplis D., Martin D. E., Orenstein J. M., Allaway G. P., Freed E. O., Wild C. T.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **100**, 13555 (2003).
7. Urban M., Sarek J., Klinot J., Korinkova G., Hajduch M.: *J. Nat. Prod.*, **67**, 1100 (2004).
8. Šarek J., Klinot J., Džubák P., Klinotová E., Nosková V., Křeček V., Kořínková G., Thomson J. O., Janošťáková A., Wang S., Parsons S., Fischer P. M., Zhelev N. Z., Hajdúch M.: *J. Med. Chem.*, **46**, 5402 (2003).
9. Hajduch M., Sarek J.: Triterpenoid derivatives. PCT Int. Patent Appl. WO0190136, 23rd May 2001.
10. Hajduch M., Sarek J.: Triterpenoid derivatives. PCT Int. Patent Appl. WO0190046, 23rd May 2001.
11. Hajduch M., Sarek J.: Triterpenoid derivatives. PCT Int. Patent Appl. WO019096, 23rd May 2001.
12. Kubelka T.: Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2008.
13. Vranková K.: Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2006.
14. Štěpánek O.: Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2006.
15. Narayanan C. R., Naik D. G.: *Indian J. Chem.*, **20**, 62 (1981).
16. Xie F., Zhang M., Zhang Ch.-F., Wang Z.-T., Kou J.-P.: *J. Ethnopharmacol.*, **117**, 463 (2008).
17. Ikeda Y., Murakami A., Ohigashi H.: *Mol. Nutr. Food Res.*, **52**, 26 (2008).
18. Shibata S.: Saponins with biological and pharmacological activity. New natural products and plant drugs with pharmacological and therapeutical activity. Edited by Wagner H., Wolf P. (Springer-Verlag, Berlin) 177 (1977).

19. Singh S., Kahjuria A., Taneja S. C., Singh J., Qazi G. N.: *Phytomedicine*, **15**, 400 (2008).
20. Holanda Pinto S. A., Pinto L. M. S., Cunhal G. M. A., Chavez M. H., Santos F. A., Rao V. S.: *Inflammopharmacology*, **16**, 48 (2008).
21. Zhou X., Lin J., Yin Y., Zhao J., Sun X., Tang K.: *Am. J. Chin. Med.*, **35**, 559 (2007).
22. Kim K.-A., Lee H.-S., Park H.-J., Kim J.-W., Kim C.-J., Shim I.-S., Kim N.-J., Han S.-M., Lim S.: *Life Sci.*, **74**, 2796 (2004).
23. Oliveira F. A., Chaves M. H., Almeida F. R. C., Lima Jr. R. C. P., Silva R. M., Maia J. L., Brito G. A. A. C., Santos F. A., Rao V. S.: *J. Ethnopharmacol.*, **98**, 103 (2005).
24. Manna P., Sinha M., Sil P. C.: *BCPT*, **101**, 333 (2007).
25. Sunitha S., Nagaraj M., Varalakshmi P.: *Fitoterapia*, **72**, 516 (2001).
26. Gong Y., Raj K. M., Luscombe C. A., Gadawski I., Tam T., Chu J., Gibson D., Carlson R., Sacks S. L.: *Antivir. Res.*, **64**, 127 (2004).
27. Nosik N. N., Deryabin P. G., Isayeva Y. I., Kondrashina N. G., Lavrukhina L. A., Inozemtsev A. N., Presnova G. A., Topoleva T. V.: *Problems of Virology*, **5**, 29 (2005).
28. Wen C.-C., Kuo Y.-H., Jan J.-T., Liang P.-H., Wang S.-Y., Liu H.-G., Lee C.-K., Chang S.-T., Kuo C.-J., Lee S.-S., Hou C.-C., Hsiao P.-W., Chien S.-C., Shyur L.-F., Yang N.-S.: *J. Med. Chem.*, **50**, 4087 (2007).
29. Kanamoto T., Kashiwada Y., Kanbara K., Gotoh K., Yoshimori M., Goto T., Sano K., Nakashima H.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 1225 (2001).
30. Kashiwada Y., Hashimoto F., Cosentino L. M., Chen Ch.-H., Garrett P. E., Lee K.-H.: *J. Med. Chem.*, **39**, 1016 (1996).
31. Kashiwada Y., Sekiya M., Ikeshiro Y., Fujioka T., Kilgore N. R., Wild C.T., Allaway G. P., Lee K.-H.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 5851 (2004).
32. Pisha E., Chai H., Lee I. S., Chagwedera T. E., Farnsworth N. R., Cordell G. A., Beecher C. W. W., Fong H. H. S., Kinghorn A. D., Brown D. M., Wani M. C., Wall M. E., Hieken T. J., Gupta T. K. D., Pezzuto J. M.: *Nat. Med.*, **1**, 1046 (1995).
33. Ryu S. Y., Choi S. U., Lee S. H., Lee Ch. O., No Z., Ahn J. W.: *Arch. Pharm. Res.*, **17**, 375 (1994).
34. Fulda S., Jeremias I., Pietsch T., Debatin K. M.: *Int. J. Cancer*, **82**, 435 (1999).
35. Kim D. S. L., Pezzuto J. M., Pisha E.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 1707 (1998).
36. Choi C. Y., You H. J., Jeong H. G.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **288**, 49 (2001).
37. Bonfils J. P., Pinguet F., Culine S.: *Planta Med.*, **67**, 79 (2001).

38. Yue P. Y. K., Mak N. K., Cheng Y. K., Leung K. W., Ng T. B., Fan D. T. P., Yeung H. W., Wong R. N. S.: *Chin. Med.*, **2**, 6 (2007).
39. Šarek J.: Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2003.
40. Urban M.: Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2005.
41. Kvasnica M.: Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2003.
42. Kvasnica M., Šarek J., Klinotová E., Džubák P., Hajdúch M.: *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 3447 (2005).
43. Kubelka T.: Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2006.
44. Frišonsová, K.: Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2007.
45. Sarek J., Hajduch M., Svoboda M., Novakova K., Spacilova P., Kubelka T., Biedermann D.: PCT/CZ/2007/000088, 25th September 2007.
46. Stucki S., Schulze S., Schuster D., Stark C.: *Pharmaceutical Engineering*, **25**, 1 (2005).
47. <http://en.wikipedia.org/wiki/Ozone>.
48. Criegee R.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **87**, 745 (1975).
49. Geletneky C., Berger S.: *Eur. J. Org. Chem.*, **8**, 1625 (1998).
50. Ruzicka L., Rey E.: *Helv. Chim. Acta*, **25**, 171 (1942).
51. Ruzicka L., Volli E., Jeger O.: *Helv. Chim. Acta*, **28**, 1628 (1945).
52. Murphy W. S., Cocker D.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 2565 (1977).
53. García-Granados A., López E. P., Melguizo E., Moliz N. J., Parra A., Simeo Y.: *J. Org. Chem.*, **68**, 4833 (2003).
54. Sukoas E., Hase T.: *Acta Chem. Scand.*, **31**, 331 (1977).
55. Sukoas E., Hase T.: *Acta Chem. Scand.*, **31**, 633 (1977).
56. García-Granados A., López E. P., Melguizo E., Parra A., Simeo Y.: *Tetrahedron*, **60**, 3831 (2004).
57. Van Ornum G. S., Champeau M. R., Pariz R.: *Chem. Rev.*, **106**, 2990 (2006).
58. Collins D. O., Ruddock P. L. D., Chiverton de Grasse J., Reynolds W. F., Reese P. B.: *Phytochemistry*, **59**, 479 (2002).
59. Ikata A., Itokawa H.: *Phytochemistry*, **25**, 1625 (1986).
60. Krasutsky P., Puschenikov A., Sergeeva T.: Selective Oxidation of Triterpens Employing TEMPO. PCT Int. Patent Appl. WO2006105354, 5th October 2006.
61. Macias F. A., Simonet A. M., Esteban M. D.: *Phytochemistry*, **36**, 1369 (1994).
62. Ruyle W. V., Jacob T. A., Chemerda J. M., Chamberlin E. M., Rosenberg D. W., Sita G. E., Erickson R. L., Aliminosa L. M., Tishler M.: *J. Am. Chem. Soc.*: **75**, 2604 (1953).

63. Paryzek Z., Martynov J.: *Can. J. Chem.*, **66**, 2130 (1988).
64. Briner E., Nicolet S., Paillard H.: *Helv. Chim. Acta*, **14**, 749 (1931).
65. Dick C. R., Hanna F.: *J. Org. Chem.*, **19**, 1218 (1964).
66. White H. M., Bailey P. S.: *J. Org. Chem.*, **30**, 3037 (1965).
67. Cerkovnik J., Plesničar B., Koller J., Tuttle T.: *J. Org. Chem.*, **74**, 96 (2009).
68. Gruselle M., Tichy M., Lefort D.: *Tetrahedron*, **28**, 3885 (1972).
69. Emerson D. W., Titus R. L., Gonzáles R. M.: *J. Org. Chem.*, **56**, 5301 (1991).
70. Klinot J.: osobní sdělení.
71. Seebacher W., Simic N., Weis R., Saf R., Kunert O.: *Mag. Res. Chem.*, **41**, 636 (2003).
72. Honda T., Rounds B.-A. V., Bore L., Finlay H. J., Favaloro F. G., Suh N., Wang Y., Sporn M. B., Gribble G. W.: *J. Med. Chem.*, **43**, 4233 (2000).
73. Waters L. W., Rollin A. J., Bradwell C. M., Schneider J. A., Aanerud T. W.: *J. Org. Chem.*, **41**, 889 (1976).
74. Tkachev A. V., Denisov A. Y., Gatilov Y. V., Bagryanskaya I. Y., Shevtsov S. A., Rybalova T. V.: *Tetrahedron*, **50**, 11495 (1994).
75. Rowland A. T., Drawbaugh R. S., Dalton J. R.: *J. Org. Chem.*, **42**, 487 (1977).
76. Denisenko M. V., Odínokova L. E., Denisenko V. A., Uvarova N. I.: *Chem. Nat. Comp.*, **27**, 374 (1991).
77. Monaco P., Caputo R., Palumbo G., Mamgoni L.: *Phytochemistry*, **12**, 939 (1973).
78. Pakrashi S. C., Bhattacharyya J., Mookerjee S., Samatan T. B., Vorbrüggen H.: *Phytochemistry*, **7**, 461 (1968).
79. De Lampasona M. E. P., Catalon C. A. N., Gerdis T. E., Herz W.: *Phytochemistry*, **49**, 2061 (1998).
80. Salle: *Suom. Kem.*, **29 B**, 175 (1965).
81. Farina C., Pinza M.: *Gazz. Chim. Ital.*, **117**, 561 (1987).
82. Denisenko M. V., Pokhilo N. D., Odínokova L. E., Denisenko V. A., Uvarova N. I.: *Tetrahedron Lett.*, **37**, 5187 (1996).

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěl poděkovat všem těm, kteří mi byli nápomocni při sepisování této práce. Především bych chtěl vyjádřit díky svému nynějšímu školiteli Doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc., za to, že se ochotně ujal pozice mého nového školitele a že svým jménem zaštitil tuto práci po zbylý čas, potřebný k jejímu vypracování.

Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Simoně Hybelbauerové za zaškolení a četné rady při měření NMR spekter. Veliký dík patří Prof. RNDr. Jiřímu Klinotovi, CSc., a RNDr. Ivě Rudovské, Ph.D., za ochotu a neocenitelnou pomoc při interpretaci spektrálních dat a RNDr. Martinu Dračínskému, Ph.D., za měření a interpretaci 2D NMR spekter. Za měření MS děkuji RNDr. Martinu Štíchovi a za měření IČ spekter pak RNDr. Stanislavu Hilgardovi, CSc. Za ochotu při měření rentgenostrukturních dat děkuji RNDr. Ivaně Císařové, CSc. Také děkuji Mgr. Bohuně Šperlichové a Jaroslavě Čečrdlové za měření optických rotací a teplot tání.

Nemalý dík patří také všem kolegům ze Skupiny přírodních látek. Za jejich ochotu pomoci a poradit a za vytvoření přátelského pracovního prostředí děkuji Mgr. Mirce Čerňové, Mgr. Lence Markové, Bc. Mgr. Pavle Spáčilové, protože je nejhodnější, Bc. Mgr. Tomáši Kubelkovi, Mgr. Martinu Vlkovi, Bc. Lucii Ducháčkové, Bc. Marku Remešovi a Bc. Michalu Tichému. Zvláště pak děkuji Mgr. Davidu Biedermannovi, Ph.D., za všechny jeho rady v otázkách chemie.

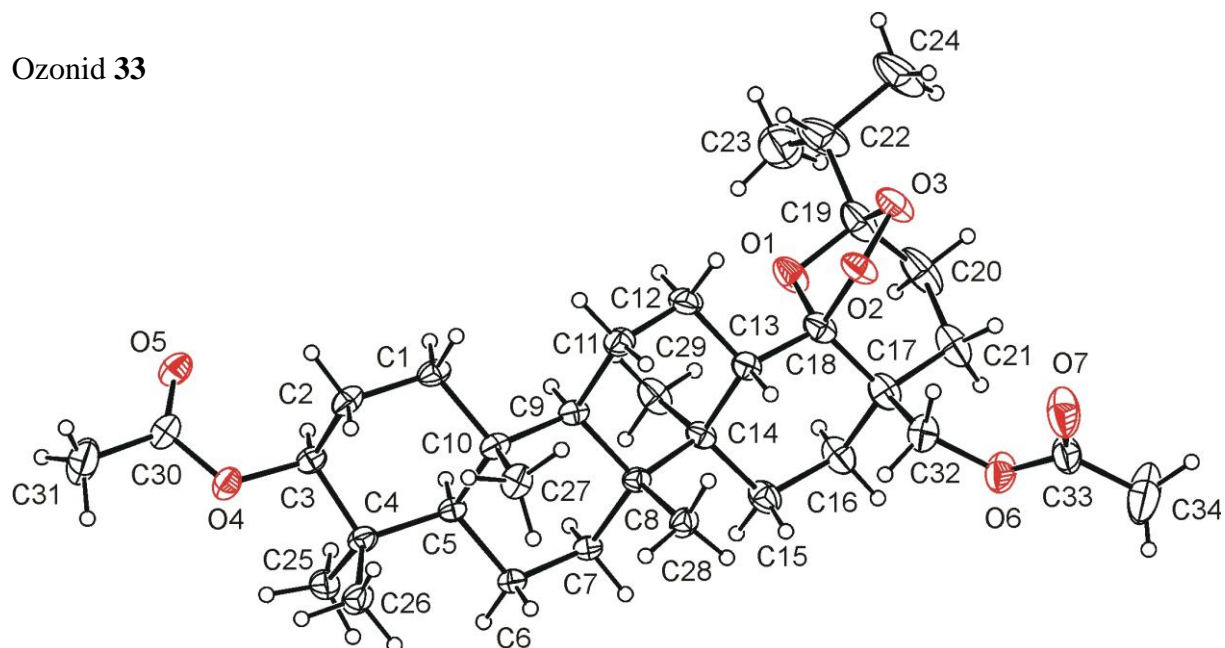
Největší díky patří mé rodině, jíž vděčím za umožnění vysokoškolského studia a za psychickou i materiální podporu během jeho průběhu.

PŘÍLOHY

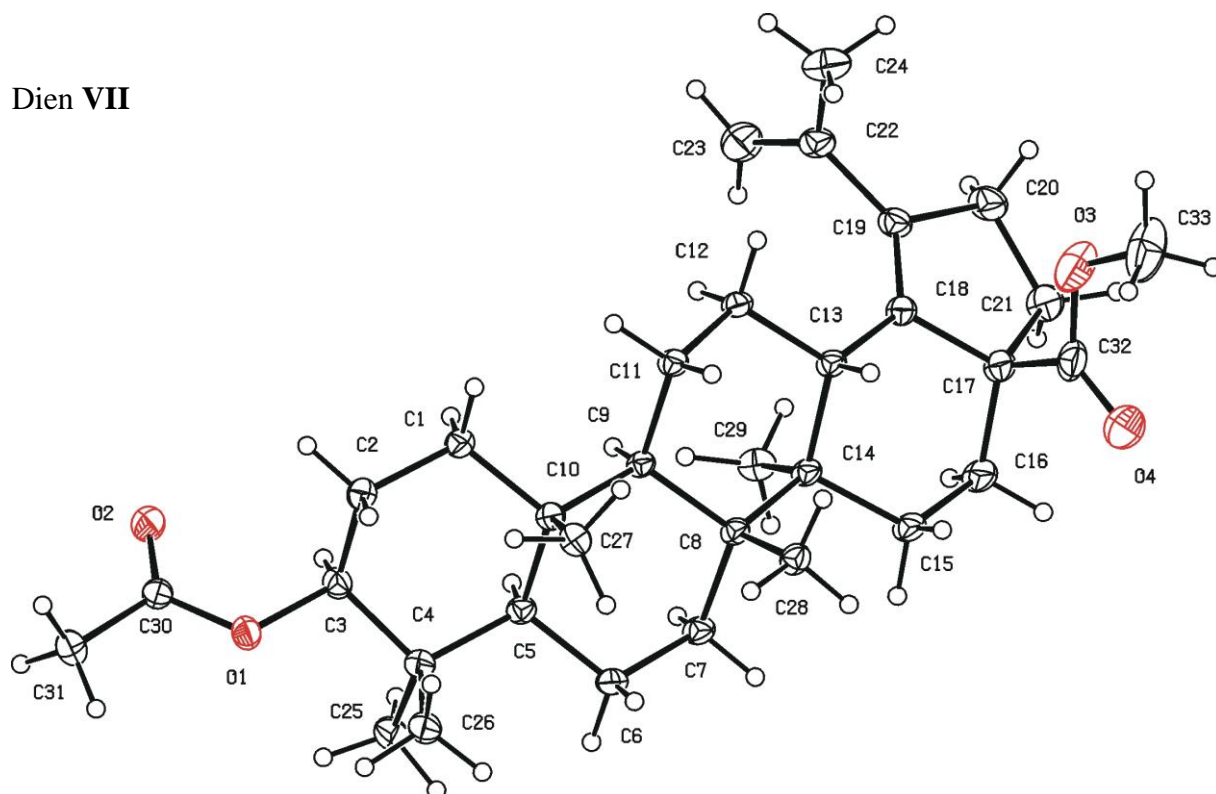
Příloha 1:

Projekce znázorňující strukturu ozonidu **33**, dienu **VII**, a diketoketonu **XI** zjištěnou pomocí rentgenové difrakce.

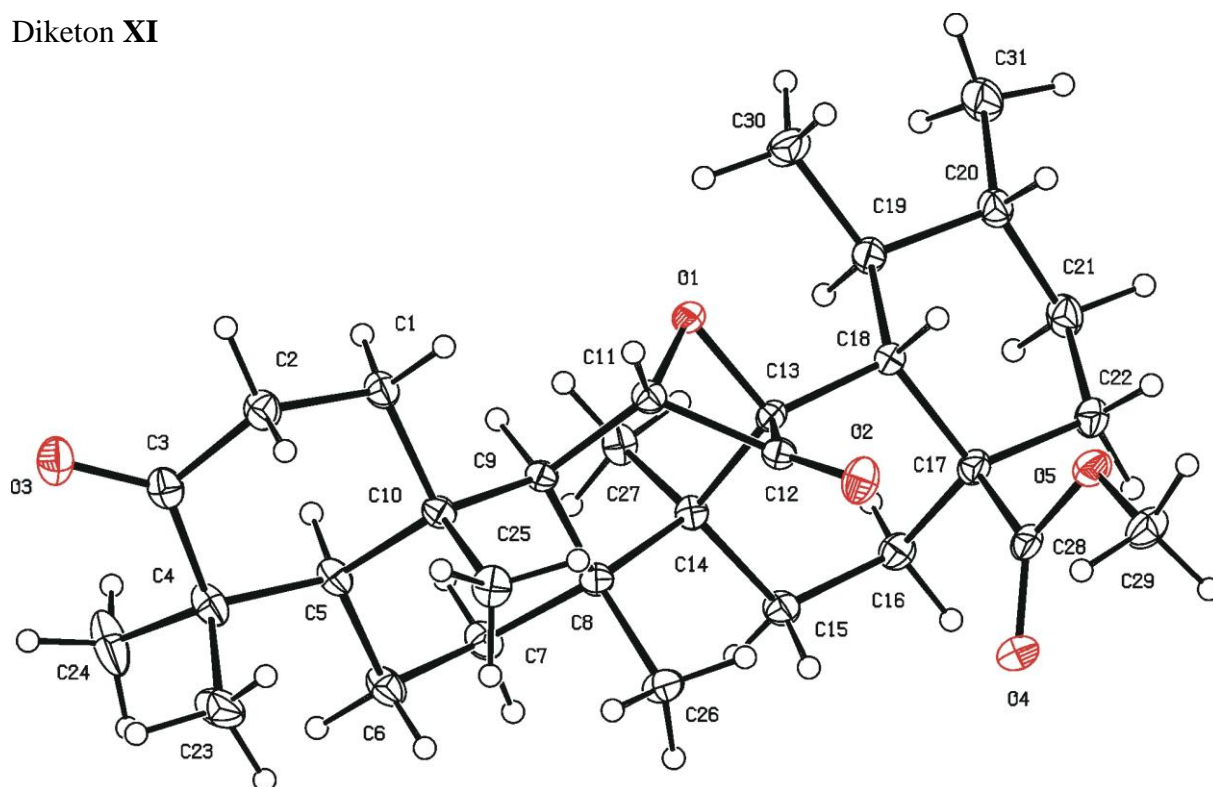
Ozonid **33**



Dien **VII**



Diketon **XI**



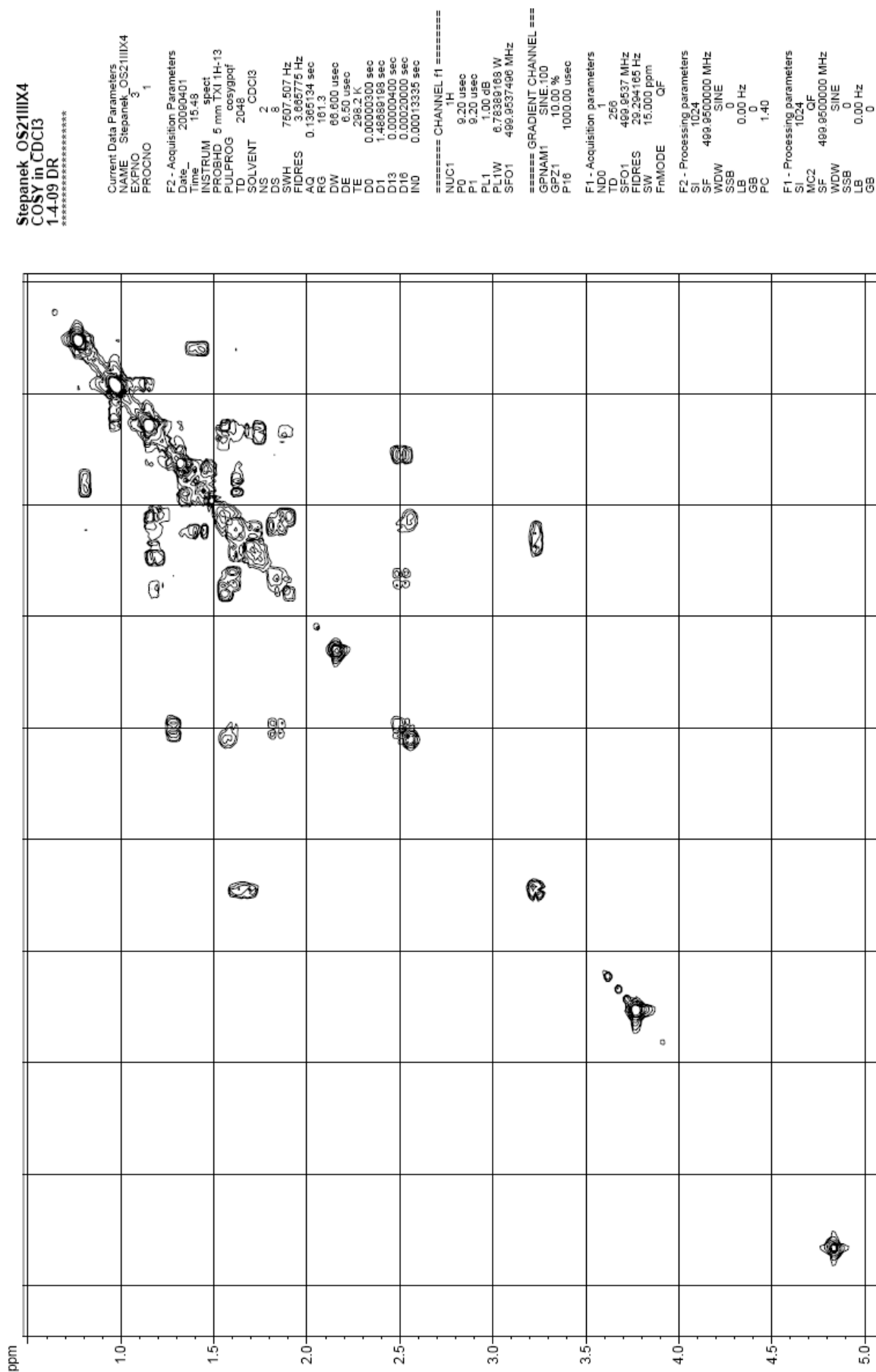
Příloha 2:

Krystalografická data a parametry upřesňování pro ozonid **33**, dien **VII**, a diketon **XI**. Z důvodu jejich značné rozsáhlosti jsou data umístěna na příloženém CD nosiči.

Příloha 3:

2D NMR spektra, na jejichž základě byla určena struktura ketonu **XII** a provedeno přiřazení signálů v ^1H a ^{13}C NMR.

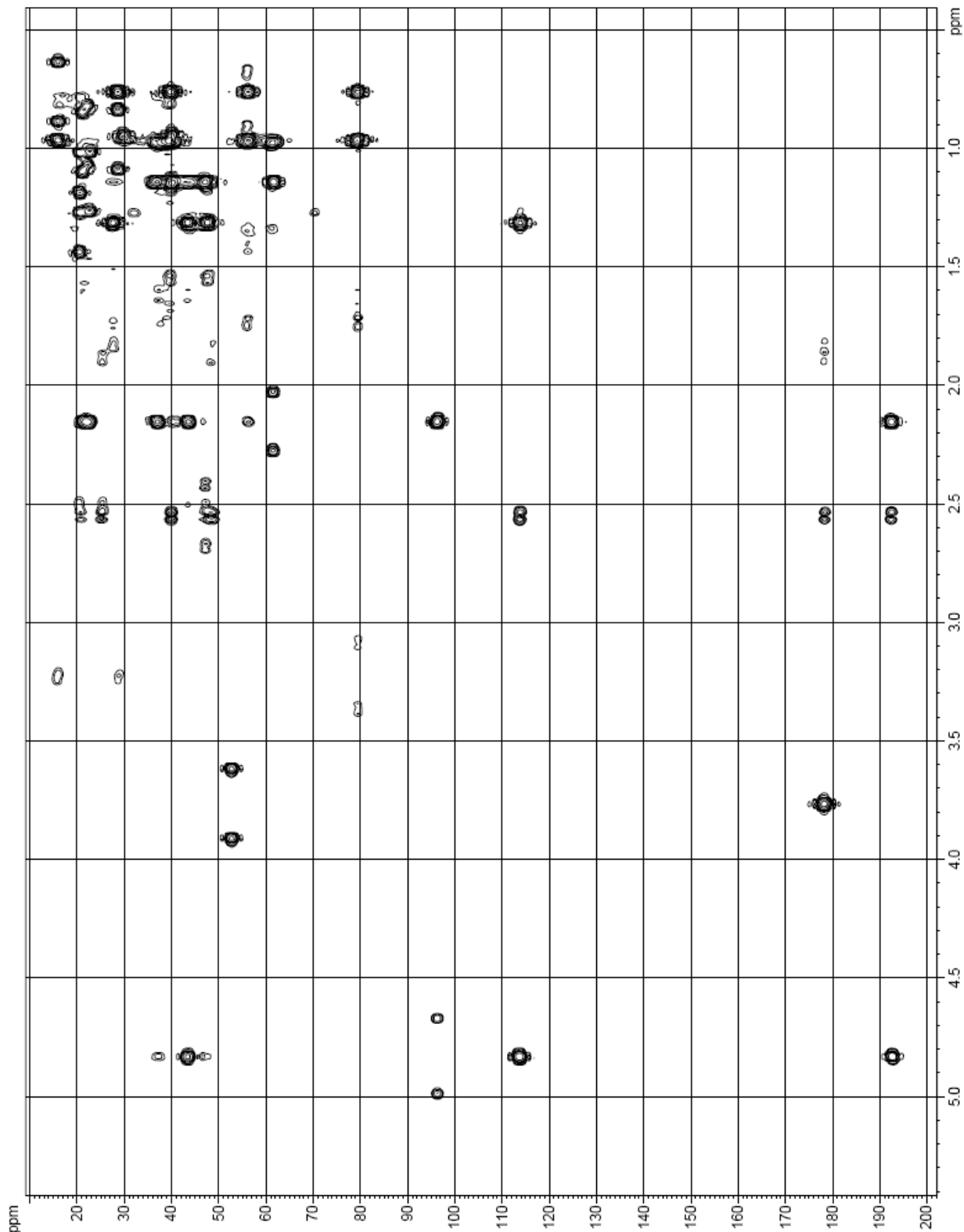
COSY spektrum ketonu XII



HMBC spektrum ketonu XII

Stepanek OS2111X4
HMBC in CDCl3
14.09 DR

```
*****
Current Data Parameters
NAME OS2111X4
EXPNO 5
PROCNO 1
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20090401
Time 15:17
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm TAI 1H-13
PULPROG zgpg30
INTEGPROG intq
SOLVENT CDCl3
NS 4
DS 5
SWH 7507.507 Hz
FIDRES 1.833888 Hz
AQ 0.779102 sec
RG 327.000
CW 66.600 usec
TE 300.2
DELTA 1.50 usec
CNGST13 8.0000000
DD 0.0000000 sec
DE 1.0000000 sec
D6 0.0000000 sec
D16 0.0000000 sec
IND 0.0001150 sec
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 9.30 usec
PL1 0.00 dB
PL12 5.70 dB
SFO1 499.9537495 MHz
===== CHANNEL f2 =====
NUC2 13C
P2 15.00 usec
PL2 0.00 dB
PL22 5.70 dB
SFO2 125.7611937 MHz
===== GRADIENT CHANNEL =====
GPM1/1 SINE 100
GPM1/2 SINE 100
GPM1/3 SINE 100
GPM2/1 SINE 100
GPM2/2 SINE 100
GPM2/3 SINE 100
GPM3/1 SINE 100
GPM3/2 SINE 100
GPM3/3 SINE 100
F16 1000.00 usec
F1 - Acquisition parameters
TD 256
SFO1 499.9537495 MHz
SFO2 125.7611937 MHz
SW 232.175 GHz
FWDW 499.9537495 MHz
F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 125.7611937 MHz
WDW 499.9537495 MHz
SSB 0
LB 0.0 Hz
GB 0.0 Hz
PC 1.40
F1 - Processing parameters
SI 1024
SF 125.7611937 MHz
WDW 499.9537495 MHz
SSB 0
LB 0.0 Hz
GB 0.0 Hz
PC 1.40
```



ROESY spektrum ketonu XII

Stepanek_OS2111IX4
ROESY in CDCl3
1.4.09 DR

Current Data Parameters
NAME Stepanek_OS2111IX4
EXPNO 6
PROCNO 1
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20090401
Time 19.51
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm TXI 1H-13
PULPROG roesyphpr
TD 2048
SOLVENT CDCl3
NS 48
DS 4
SWH 5122.951 Hz
FIDRES 2.501441 Hz
AQ 0.2000324 sec
RG 60.5
DW 97.600 usec
DE 6.50 usec
TE 298.2 K
D0 0.00008774 sec
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
D12 0.00002000 sec
D13 0.00009400 sec
IN0 0.00019520 sec
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 9.20 usec
PL1 300000.00 usec
PL2 1.00 dB
PL3 53.42 dB
PL11 21.72 dB
PL1W 6.78389168 W
PL1W 0.00003898 W
PL11W 0.05747500 W
SFO1 499.9523498 MHz
F1 - Acquisition parameters
ND0 1
TD 256
SFO1 499.9523 MHz
FIDRES 20.011528 Hz
SW 10.247 ppm
FMODE States-TFPI
F2 - Processing parameters
SI 2048
SF 499.949823 MHz
WDW 2
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00
F1 - Processing parameters
SI 1024
MC2 States-TFPI
SF 499.949821 MHz
WDW 2
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0

